

# **Hochdruck NMR**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der naturwissenschaftlichen Fakultät III

– Biologie und vorklinische Medizin –

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Martin Reinhard Arnold

aus München

2002

Promotionsgesuch eingereicht am 14.2.2002

Die Arbeit wurde angeleitet von :

Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prof. Dr. Hans-Dietrich Lüdemann

Prüfungsausschuss :

Vorsitzender : Prof. Dr. Rüdiger Schmitt

1. Prüfer : Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

2. Prüfer : Prof. Dr. Hans-Dietrich Lüdemann

3. Prüfer : Prof. Dr. Hartmut Krienke

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	5
2. Die Hochdruckanlagen .....	9
2.1. Die Borosilikatglaskapillaren .....	9
2.2. Quarzkapillaren und Saphirzellen .....	11
2.3. Vergleich der Qualität der Spektren in Hochdruckkapillaren .....	12
2.4. Hochdruckeinsätze für Bruker DRX 600 und DMX 500 .....	14
2.5. Die Druckbank mit Spindelpresse .....	24
2.6. Die automatische Druckbank mit Drucksprungeinrichtung .....	25
2.6.1. Die Kompressibilität von Wasser .....	26
2.6.2. Die mechanische Ausführung der Drucksprunganlage .....	27
2.6.3. Elektronische Steuerung .....	31
3. $T_1$ -Relaxation und Intradiffusion von Wasser .....	34
3.1. Einführung .....	34
3.2. Materialien und Methoden .....	35
3.2.1. Aufbereitung der Proben .....	35
3.2.2. Ausführung der NMR-Messungen .....	36
3.3. Ergebnisse und Diskussion .....	37
3.3.1. Die Selbstdiffusionskoeffizienten von D <sub>2</sub> O und H <sub>2</sub> O .....	37
3.3.2. <sup>2</sup> H und <sup>17</sup> O Spin-Gitter-Relaxationsmessungen .....	39
4. Druckabhängigkeit des Modellpeptidsystems H-Gly-Gly-X-Ala-OH .....	47
4.1. Materialien und Methoden .....	47
4.1.1. Vorbereitung der Proben und Zusammensetzung der Stammlösungen .....	47
4.1.2. Ausführung der NMR-Messungen .....	48
4.1.3. Darstellung der Messwerte und Fehlerangaben .....	49
4.2. Ergebnisse und Diskussion .....	50
4.2.1. Messungen in Phosphatpuffer und Einfluss des pH .....	50
4.2.2. Vergleich von Tris/HCl- und Phosphatpuffer .....	54
4.2.3. Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen .....	58
4.2.4. Lineare druckinduzierte Verschiebungen im Proteinrückgrat .....	69
4.2.5. Druckabhängigkeiten in den Seitenketten .....	70
4.2.6. Nichtlineare Druckabhängigkeiten .....	71
4.2.7. Druckverhalten der skalaren Kopplungen .....	73
4.2.8. Einfluß der benachbarten Aminosäuren auf den Druckgradienten .....	73
4.2.9. Prolin cis-trans Isomerisierung .....	74
4.2.10. Druckabhängigkeit der Signaltolumina und Austauschraten .....	76
5. Hochdruck NMR am Kälteschockprotein <i>TmCsp</i> .....	78
5.1. Funktion und Eigenschaften der Kälteschockproteine .....	78
5.2. Proteinfaltung und Denaturierung .....	81
5.2.1. Messungen von Gleichgewichten in der NMR .....	85
5.2.2. Aussagekraft der chemischen Verschiebung von <sup>15</sup> N <sup>ε</sup> , <sup>1</sup> H und <sup>13</sup> C <sup>ε</sup> .....	87
5.3. Materialien und Methoden .....	90
5.3.1. Expression und Aufreinigung von <i>TmCsp</i> .....	90
5.3.2. Zusammensetzung der NMR-Proben .....	90

5.3.3.	NMR-Messtechnik .....	90
5.3.4.	Einstellung von Druck und Temperatur .....	91
5.3.5.	Auswertung der Daten .....	92
5.4.	Ergebnisse und Diskussion .....	93
5.4.1.	Einfluss des Puffersystems .....	93
5.4.2.	Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen .....	97
5.4.3.	Vergleich der Druckdaten mit anderen Proteinen .....	103
5.4.4.	Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen .....	104
5.4.5.	Korrelationen der Druck- und Temperaturkoeffizienten .....	109
5.4.6.	Vergleich von quadratischem und linearem Temperaturkoeffizient .....	113
5.4.7.	Skalierung der Auftragung linearer gegen quadratische Koeffizienten .....	113
5.4.8.	Ableitung der Formeln zur Berechnung .....	116
5.4.9.	Quadratischer und linearer Koeffizient in normierter Skala $T^*$ .....	117
5.4.10.	Tieftemperaturdenaturierung .....	117
5.4.11.	Einfluss von Druck auf die Signalvolumina .....	121
5.4.12.	Einfluss der Temperatur auf die Signalvolumina .....	123
5.4.13.	Einzelbetrachtung einiger Aminosäuren .....	125
5.5.	Druckabhängigkeit der $J$ -Kopplungen .....	129
6.	Hochdruckmessungen residualer Dipolkopplungen .....	131
6.1.	Materialien und Methoden .....	132
6.1.1.	Vorbereitung der Proben .....	133
6.1.2.	NMR-Messtechnik .....	133
6.1.3.	Einstellung von Druck- und Temperatur .....	133
6.1.4.	Auswertung der Daten .....	133
6.2.	Ergebnisse und Diskussion .....	134
6.2.1.	Druckstabilitätsmessungen an DMPC/DHPC/CTAB .....	134
6.2.2.	Restdipolkopplungen von $TmCsp$ .....	135
6.2.3.	Hochdruckstrukturberechnungen von $TmCsp$ .....	138
7.	Literatur .....	141
8.	Zusammenfassung .....	152
9.	Danksagung .....	153
10.	Anhang .....	154
10.1.	Ergebnisse der Messung von $T_l$ und Diffusion an Wasser .....	154
10.2.	Tabellierte Daten von $TmCsp$ .....	156
10.2.1.	Druckabhängigkeit des Puffersystems .....	156
10.2.2.	Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung .....	160
10.2.3.	Temperaturabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen .....	165
10.2.4.	Druck- und Temperaturabhängigkeit der Signalvolumina .....	172
10.2.5.	Die $J$ -Kopplungen .....	177
10.3.	Restdipolkopplungen .....	178
10.3.1.	Druckabhängigkeiten der Phospholipidbicellen .....	178
10.3.2.	Die Restdipolkopplungen von $TmCsp$ .....	179

## 1. Einleitung

Zum Verständnis von biochemischen Funktionsabläufen in der Zelle müssen möglichst viele Informationen über Struktur und Dynamik aller am Metabolismus beteiligten Reaktionspartner bekannt sein. Da das funktionelle Verhalten von Stoffen wie z.B. Proteinen wesentlich durch das Lösungsmittel bestimmt wird, sollte die Untersuchung in einer Umgebung stattfinden, die der natürlichen möglichst nahe kommt. Damit ist die NMR gegenüber anderen Untersuchungsmethoden zur Proteinstrukturaufklärung wie Röntgenstrukturanalyse oder Neutronenstreuung, für die das Protein in kristallisierter Form vorliegen muss, eindeutig zu bevorzugen.

Im Allgemeinen wird bei NMR-Messungen als thermodynamischer Parameter nur die Temperatur variiert, was insbesondere bei Studien zur Proteinfaltung von Nachteil ist, da zu hohen Temperaturen hin die Entfaltung meist irreversibel verläuft, andererseits der Weg zur oft reversibel verlaufenden Tieftemperaturdenaturierung durch den Gefrierpunkt des Lösungsmittels Wasser verschlossen bleibt. Einen Ausweg und Quelle weiterer Daten stellt hier die Hochdruck NMR dar, bei einem Druck von 0,2 GPa bleibt Wasser bis unter  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  stabil in der flüssigen Phase, womit die Möglichkeit zur Beobachtung der Tieftemperaturentfaltung gegeben ist (Jonas 1982). Nicht nur die Tieftemperaturentfaltung sondern auch andere Effekte bei NMR Messungen an Biopolymeren unter Hochdruck sind auf Anomalien des Wassers zurückzuführen. Aus diesem Grund wurden einige ergänzende Messungen zu Intradiffusion und Relaxationszeiten des Systems Wasser durchgeführt, die das notwendige Verständnis von Veränderungen in Proteinspektren durch Applikation von Druck bei verschiedenen Temperaturen erbringen.

Wie die Temperatur führt auch Druck zu strukturellen Veränderungen, bis hin zur vollständigen Entfaltung von Proteinen. Von Vorteil ist, dass der Grad der Entfaltung leicht gesteuert werden kann und in den bisher beobachteten Fällen an kleinen Proteinen reversibel verläuft, wie zahlreiche Arbeiten von Akasaka et al. (1997), Li et al. (1998,1999), Kalbitzer et al. (1981,2000) und Fujii et al. (1999) belegen. Bei allen Betrachtungen von Strukturen muss jedoch betont werden, dass jedes Protein über eine spezifische Bandbreite möglicher Faltungen verfügt, wobei nur deren zeitliches Mittel der NMR Messung zugänglich ist. Die moderate Variation von Druck oder Temperatur führt nun zu einer reversiblen Verschiebung der Wahrscheinlichkeiten zwischen unterschiedlichen Faltungszuständen des Proteins (Inoue et al. 2000), die sich auch in Änderungen des zeitlichen Mittels der Strukturen äußert. Die Limitierung des Drucks aufgrund experimenteller Gegebenheiten erlaubte nur die Beobachtung reversibler Änderungen des hier untersuchten Kälteschockproteins *TmCsp*, irreversible Entfaltungen konnten nur durch Steigerung der Temperatur initiiert werden.

Kommt es bei höheren Drücken zur Denaturierung ist das Ergebnis ähnlich, aber nicht gleich dem der durch Temperaturerhöhung hervorgerufenen strukturellen Veränderung. Als frühes Beispiel kann die bereits 1914 verfasste Arbeit von P.W. Bridgman über die Druckdenaturierung an Hühnereiweiß genannt werden, die mit ihrer Thematik auch einen interessanten Anwendungsbereich der Hochdrucktechnologie mit zunehmender Bedeutung in der Lebensmittelindustrie andeutet. Die gut zu kontrollierende Applikation des Drucks ermöglicht dosierte Pasteurisierung, oder besser „Pascalisierung“ (Tonello et al. 1999), bei gleichzeitiger Schonung von Vitaminen und anderen erwünschten Inhaltsstoffen (Lambert et al. 1999). Daneben ergeben sich auch neue Möglichkeiten im „Food-Design“ durch die mit der Druckanwendung einhergehende Texturveränderungen der Inhaltsstoffe (Hubbard et al. 2000, Fuchigami & Teramoto 1999)

Die Anwendung von Druck ermöglicht auch den Austausch des Lösungsmittels Wasser durch Stoffe, die unter Normalbedingungen nicht in flüssiger Phase vorliegen. Ein technisch besonders interessantes Verfahren mit hohem Zukunftspotential ist überkritisches CO<sub>2</sub>, das sich durch seine guten Lösungseigenschaften zur Extraktion von Aromastoffen aus Lebensmitteln auszeichnet und sich im Gegensatz zu sonst üblichen Lösungsmitteln beim Absenken des Drucks wieder ohne Rückstand verflüchtigt. Neben dieser großtechnischen Verwendung kann CO<sub>2</sub> oder flüssiges Xe bei NMR Studien mit eher akademischer Fragestellung hilfreich sein. Beide Lösungsmittel sind frei von Protonen, damit bleiben auch die NMR Protonenspektren frei von störenden Artefakten, ebenso können Protonen des zu untersuchenden Stoffes nicht mit dem Lösungsmittel austauschen, sodass deren Signale im Spektrum erhalten bleiben. Weiterhin sind die Viskositäten beider überkritischer Lösungsmittel geringer als die von Wasser, was zu Verbesserungen in der Signalqualität bei großen Proteinen durch Reduktion der  $T_2$ -Relaxation führt (Gaemers 1999).

Zuletzt sei noch auf die Existenz von barophilen Tiefseebakterien verwiesen, deren Stoffwechsel an die extremen Bedingung angepasst sein muss. Die in der Natur erreichten Drücke liegen weit unter den in dieser Arbeit verwendeten. Für barophile Bakterien, die aus Sedimenten des Marianengrabens (10.898 m) isoliert wurden, stellte Li et al. (1999) optimales Wachstum zwischen 70 und 80 MPa fest. Yayanos (1999) untersuchte ebenfalls das Wachstum verschiedener Tiefseebakterien, um durch Variation von Temperatur und Druck die optimalen Bedingungen des Habitats zu finden. Bemerkenswert ist, dass Lebensräume mit den gefundenen optimalen Bedingungen heute nicht mehr existieren.

So vielseitig die Anwendungsgebiete sein mögen, so schwierig ist die praktische Umsetzung der Experimente. Grundsätzlich existieren zwei verschiedene Ansätze zur Hochdruck NMR, einerseits die Verwendung spezieller Probenköpfe, die als Hochdruck-autoklav konstruiert sind (Ballard et al. 1998, Bachl 1988). Hier stellt sich vor allem das Problem der elektrischen Durchführung des HF-Signals in den Probenbereich mit hoher Druckfestigkeit der Dichtungen bei gleichzeitiger niedriger parasitärer Kapazität der Leitungen zum Erdpotential des Autoklaven (H.-D.Lüdemann persönliche Mitteilung). Diese Schwierigkeiten vereiteln die Herstellung von Probenköpfen mit mehreren Resonanzen, die für die moderne mehrdimensionale NMR unerlässlich sind.

Der zweite Ansatz ist die Verwendung von speziell angefertigten hochdruckfesten Glas- oder Saphirkapillaren in Standardprobenköpfen (Yamada 1974, Price & Lüdemann, 1997, Yamada et al. 2000). Diese Systeme erschließen die gesamte Bandbreite der NMR Experimente. Nachteilig wirkt sich hier nur der Verlust an Empfindlichkeit durch das geringe Probenvolumen aus. Verlängerte Messzeiten, moderne Hochfeldmagnete, hoch-feste Saphirzellen und in Zukunft auch Kryoprobenköpfe mit reduziertem thermischen Rauschen können dies jedoch kompensieren. Diese Methode wurde 1974 von H.Yamada erstmals vorgestellt und seitdem in modifizierter Form auch an der Universität Regensburg durch die Arbeitsgruppe Lüdemann zum Studium zahlreicher niedermolekularer Systeme angewendet. Ziel dieser Dissertation war neben vielfältigen Messungen das vorhandene Hochdrucksystem der Bauart Lüdemann an die 500 MHz und 600 MHz Spektrometer anzupassen und wesentliche Teile neu zu entwickeln. Als erheblicher Fortschritt haben sich dabei die neuen Einkristall-Saphirzellen erwiesen, die bei geringerem Außen-durchmesser das doppelte Probenvolumen bieten, wobei zusätzlich noch der Herstellungs-aufwand drastisch reduziert wurde. Da die technischen Aspekte der Hochdruckanlagen sehr umfangreich sind, wird ihnen ein eigenes Kapitel zu Beginn der Arbeit gewidmet. Die Kenntnis über die vielfältigen Schwierigkeiten der Hochdrucktechnik ist unabdingbar zur Beurteilung der Spektrenqualität.

Im Abschnitt über die Ergebnisse der Arbeit wird zunächst das Druckverhalten eines 1979 von Wüthrich eingeführten random-coil-Modellpeptidsystems vorgestellt. Zweck der Einführung von random-coil-Modellen ist es, durch Vergleich der chemischen Verschiebungen mit Daten aus Messungen an Proteinen, Aussagen über die Proteinfaltung zu gewinnen. Da durch Einwirkung des Drucks auch der pH des Systems aus Lösungsmittel und gelöstem Stoff verschoben wird, wurden die Messungen an den Modellpeptiden in verschiedenen Puffersystemen und bei verschiedenen pH Werten vorgenommen, um eine Unterscheidung von Druck und pH Effekten zu ermöglichen.

Eine erste Anwendung erfahren diese Daten in den Untersuchungen am Kälteschockprotein *TmCsp* (*Csp* = cold shock protein) des hyperthermophilen Bakteriums *Thermotoga maritima* (*Tm*). *Tm* wurde 1986 (Huber et al. 1996) in heißen unterseeischen Quellen entdeckt. Dem Lebensraum entsprechend ist Wachstum von 55 °C bis 90 °C mit einem Optimum bei 80 °C möglich (Welker 1999). Andere nicht hyperthermophile Lebewesen sind aufgrund der Denaturierung ihrer Proteine bei diesen Temperaturen nicht überlebensfähig. Obwohl die gesamte belebte Natur aus dem gleichen Satz von 20 Aminosäuren aufgebaut ist, ist es umso erstaunlicher, dass alleine durch die Sequenz dieser Bausteine gesteuert eine Anpassung des Lebens an Temperaturen nahe des Gefrierpunkts im Polarmeer bis zu siedendheißen Tiefseequellen stattgefunden hat. Alle Faktoren, wie erhöhte Packungsdichte (Karshikoff & Ladenstein 1998), Immobilisierung von C- und N-Terminus und Verkürzung von Schleifenregionen (Mueller et al. 2000), die auch die Struktur von *TmCsp* gegen Temperaturschwankungen stabilisieren, sind letztendlich nur auf die Sequenz der Aminosäuren zurückzuführen.

Die hohe Temperaturstabilität macht *TmCsp* zu einem attraktiven Studienobjekt, erleichtert sie doch Expression und Aufreinigung des Proteins und erlaubt umfassende thermodynamische Studien, deren Ergebnisse in der Arbeit vorgestellt werden. Die Änderungen der chemischen Verschiebung sowie der Signalvolumina in den Spektren erlauben hier qualitative und auch quantitative Aussagen über die Stabilität des Proteins. Erkenntnisse über die Funktionalität des Proteins *TmCsp* stehen dabei zwar nicht im Vordergrund, sind aber für das Verständnis der Messresultate hilfreich.

Neben *TmCsp* sind Kälteschockproteine auch in *E. coli* und *B. subtilis* bekannt, deren Sequenzhomologien von 45% bis 99% reichen (Welker 1999). Viele *Csp* werden erst bei Absenken der Temperatur induziert, über die Funktion ist wenig bekannt, es existieren jedoch Funktionsmodelle, die *TmCsp* die Fähigkeit zuschreiben bei tiefen Temperaturen *mRNA* zu binden und damit eine weitere Translation zu verhindern (Graumann et al. 1997).

Der Tertiärstruktur aller *Csp* gemeinsam ist das Motiv aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Strängen, die in zwei  $\beta$ -Faltblättern angeordnet sind, das gesamte Gebilde wird als  $\beta$ -Faß bezeichnet (Kremer et al. 2001).

Um die strukturellen und thermodynamischen Eigenschaften zu studieren, wurden zahlreiche Messungen der chemischen Verschiebungen und Signalvolumina von *TmCsp* im Druckbereich von 0,1 MPa bis 200 MPa vorgenommen. Als zusätzlicher Parameter wurde die Temperatur im Bereich von 255 K bis 348 K variiert. Diese Messungen erlauben viele Einblicke in das Verhalten des Proteins, jedoch keine fundierte Beschreibung der Struktur.

Die Strukturbestimmung von Proteinen basiert meist auf der Bestimmung interatomarer Abstände durch NOE Kontakte. Diese Methode wurde auch von Kremer et al. (2001) zur Messung und Berechnung der Struktur von *TmCsp* angewendet. Für die Hochdruck NMR ist dieses Verfahren aufgrund des stark reduzierten Probenvolumens in den druckfesten

Kapillaren und der grundsätzlich sehr niedrigen Signalintensität von NOE Kontakten wenig geeignet.

Als Alternative bietet sich die Nutzung von Restdipolkopplungen in orientierenden Medien an. Diese bereits 1964 von Saupe vorgestellte Methode und von Bax et al. 1997 erstmals auf Proteine angewandte Technik erlaubt die Messung der Orientierung von Kernverbindungsvektoren koppelnder Kerne relativ zum äußeren Magnetfeld und damit die Bestimmung der Struktur des Proteins bei einer Intensität der Messsignale, die auch für Hochdruckmessungen ausreichend ist. Voraussetzung hierfür ist allerdings eine Struktur, die nicht zu stark von den bereits bekannten Strukturen, die klassisch durch NOE Kontakte bei Normaldruck ermittelt wurden, abweicht. In der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen eine Hochdruckstruktur bei 330 K und 150 MPa von *TmCsp* auf der Basis residualer Dipolkopplungen zu bestimmen, als Ausgangsstruktur wird die von Bamann (2001) gelöste Struktur verwendet. Auf die Aspekte der Strukturbestimmung unter Verwendung von Restdipolkopplungen wird im Ergebnisteil näher eingegangen.

Die Daten aus den bisher beschriebenen Abschnitten liefern durch die geringe Zeitauflösung der NMR nur Messwerte von stationären Zuständen oder langsam ablaufenden Vorhängen wie z.B. dem Austausch von Protonen. Die schnelle Kinetik der Konformationsumwandlungen eines Proteins während der Faltung bleibt damit jedoch verborgen. Um die Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionen und Umwandlungsprozessen ermitteln zu können, existieren die seit langem bekannten Methoden wie Drucksprung (Clegg 1976, Maik et al. 1999, Woenckhaus et al. 2000, 2001), Temperatursprung (Akasaka & Kwakami 2001) und nicht zuletzt die sehr verbreitete Stop-Flow Technik. Zur Messung des Drucksprungs werden im Allgemeinen sehr sensitive optische Verfahren verwendet, sodass oftmals ein einziges Experiment genügt. Ein Drucksprung wurde z.B. von Strehlow & Becker (1959) mit einer Berstscheibe erzeugt, die naturgemäß nur einmal zu verwenden ist. Soll dagegen die Messung mittels NMR ausgeführt werden, muss der Versuch mit höchster Genauigkeit sehr oft reproduziert werden. Techniken wie Kompression eines Autoklaven durch das Magnetfeld starker Ströme (Platz & Hoffman 1972), oder mechanische Pumpen scheiden wegen der Nähe des NMR Magneten aus. Der Einsatz von Piezoaktoren (Clegg & Maxwell 1976) scheitert am geringen Hub. Um die Einstellung der Amplitude des Drucksprungs in einem weiten Bereich zu ermöglichen wurde auf Basis pneumatisch betätigter Hochdruckventile eine Drucksprungapparatur aufgebaut. Als Nebeneffekt erlaubt die Apparatur automatische Messungen von Druckreihen.



## 2. Die Hochdruckanlagen

Ein wesentlicher Anteil der Arbeit bestand in der Adaption der vorhandenen Druckanlagen an die Gegebenheiten der Spektrometer DRX 600 und DMX 500. Gegenüber den bisher zu Hochdruckmessungen verwendeten Magneten mit weiter Bohrung (widebore) ist der zur Verfügung stehende Platz bei Spektrometern neuerer Bauart erheblich eingeschränkt. Damit war eine komplette Neukonstruktion der Hochdruckeinsätze für die NMR-Spektrometer notwendig. Dies bot die Gelegenheit, ein flexibel einsetzbares Baukasten-system für Hochdruckmessungen zu gestalten. Die Komponenten der Hochdruckeinsätze sind in der Übersichtszeichnung Abb.2.6. dargestellt, genaue Maßzeichnungen finden sich in Abb.2.7. - Abb.2.13.

Da die bisher verwendeten Hochdruckkapillaren nach der bekannten „Yamada Glaszellen Methode“ (Yamada 1974, 2001, Price & Lüdemann 1997) einen sehr engen Hals als Druckzuführung aufweisen und der Innendurchmesser dieses Halses nicht definiert herzustellen ist, müssen insbesondere für die Drucksprungeinrichtung Saphirzellen eingesetzt werden. Der neu entwickelte Autoklav zur Druckübertragung auf die Saphirzellen ist mit den bisher entwickelten Teilen des Hochdrucksystems kompatibel. Da sich die Saphirzellen inzwischen bei zahlreichen Messungen bewährt haben, wurde damit auch ein entscheidender Fortschritt in der Hochdruck-NMR erreicht. Der Aufwand zur Fertigung der Kapillaren wurde drastisch reduziert und das aktive Volumen gegenüber den bisherigen Kapillaren verdoppelt. Spektren zum Vergleich der Signalqualität beider Kapillaren folgen weiter unten. Da die bewährten Borosilikatglaskapillaren zur Messung der meisten Daten in dieser Arbeit verwendet wurden und für Spezialanwendungen bei Drücken über 200 MPa auch in Zukunft eingesetzt werden können, wird auch auf Herstellung und Festigkeit dieser Kapillaren eingegangen.

Um tiefere Einblicke in das dynamische Verhalten von Proteinen zu erlangen, wurde ein System zur Erzeugung von Druckstößen aufgebaut. Durch die bekanntermaßen langen NMR-Experimente mit hohen Wiederholraten, ergibt sich für ein derartiges System die Notwendigkeit extremer mechanischer Belastbarkeit bei höchster Wiederholungsgenauigkeit der Druckstöße.

Um die Messzeit an den Spektrometern besser nutzen zu können, erlaubt dieses System auch die Ausführung automatischer Messungen von mehreren Spektren bei verschiedenen Druckstufen. Dazu wurde eine Microcontroller gesteuerte Druckregelung entworfen und aufgebaut. Die Einstellung des Druckes erfolgt direkt aus den Pulsprogrammen heraus. Der Druckverlauf wird von einem PC protokolliert, sodass verlässliche Messreihen aufgenommen werden können.

### 2.1. Die Borosilikatglaskapillaren

Wie ausführlich in den Arbeiten von Yamada (1974, 2001) sowie Price & Lüdemann (1997) beschrieben, werden Borosilikatglaskapillaren (DURAN 50 von Schott) an einem Ende verschmolzen und am anderen Ende in der Flamme zu einem langen Hals von ca. 1 mm Durchmesser ausgezogen. Diese Minimierung des Querschnittes reduziert einerseits das benötigte Probenvolumen, andererseits auch die bei hohen Drücken auftretenden Scherkräfte auf die Verklebung der Kapillare mit den Titannippeln, die zur Verbindung mit der Hochdruckleitung dienen (Abb.2.1.). Als Klebstoff wird Eccobond 104 verwendet, der 24 Stunden bei 120 °C ausgehärtet wird.

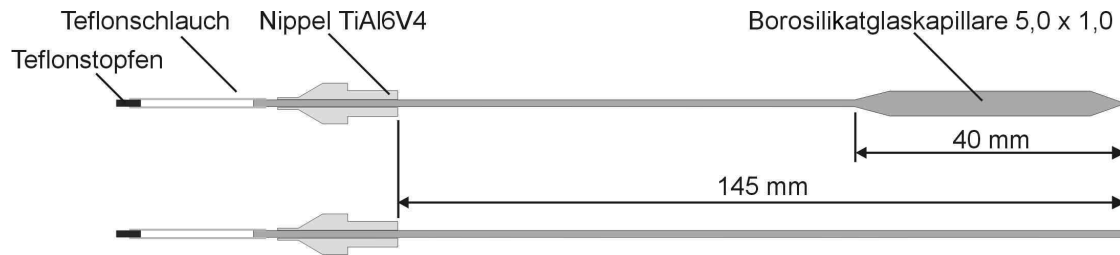


Abb.2.1. Duran 50 Glaskapillare eingeklebt in Titandichtnippel. Die saubere Trennung des Druckmediums vom Probenmaterial gewährleistet ein flexibler Teflonschrumpfschlauch, der mit einem Teflonstopfen verschlossen wird. Einzelne Exemplare der 5 mm Kapillaren sind bis 400 MPa einsetzbar, die untere 1 mm Kapillare ist bis 400 MPa zu verwenden.

DURAN 50 Borosilikatglas gehört zum Pyrex Glastyp mit  $\text{SiO}_2\text{-B}_2\text{O}_3\text{-Na}_2\text{O}$  als Hauptbestandteilen. Das Mischungsverhältnis bietet einerseits einen minimalen Ausdehnungskoeffizienten, andererseits niedrige Verarbeitungstemperatur, sowie eine geringe Neigung zur Phasentrennung (Vogel 1992). Durch den geringen Ausdehnungskoeffizienten wirken sich thermische Spannungen im Material nicht gravierend auf die Festigkeit aus, dennoch war es notwendig die Kapillaren nach der Bearbeitung bei 500 °C 24 Stunden zu tempern.

Durch Phasentrennungsprozesse beim Erstarren der Glasschmelze bilden sich vornehmlich auf der Oberfläche halb elliptische Fehlstellen aus, die zu einer Verringerung der Zugfestigkeit des Glases führen (Vogel 1992). Zum Entfernen dieser Fehlstellen wurden die Kapillaren auf der Innenseite mit 10 % HF geätzt (Price & Lüdemann 1997). Quantitativ wurde der Effekt an dünnen Glasstäben nachgewiesen, deren Zugfestigkeit nach dem Ätzen um mehr als den vierfachen Wert anstieg (Vogel 1992). Zur Anwendung kamen Kapillaren mit verschiedenen Außen- und Innendurchmessern. Vor dem Einsatz im Spektrometer erfolgte ein Drucktest, dazu wurde alle drei Stunden der Druck um 10 MPa erhöht, bis der gewünschte Enddruck von 250 MPa erreicht war. Es zeigte sich dabei deutlich, dass mit schnellerem Inkrementieren des Druckes die Ausbeute an Kapillaren sank. Diese Beobachtung kann aufgrund der geringen Stückzahl gefertigter Kapillaren statistisch zwar nicht belegt werden, der Effekt ist jedoch durch die amorphe Struktur des Glases zu erklären. Da kein Kristallgitter vorhanden ist, kann auch kein fester Schmelzpunkt existieren, damit ist selbst bei Raumtemperatur noch eine gewisse Restbeweglichkeit der Glasbestandteile gegeben, die zum „Ausheilen“ von Fehlstellen führt. Der Effekt des Ausheilens wird in der Literatur beschrieben (Vogel 1992).

Für alle geprüften Kapillaren wurde der Berstdruck, bzw. der maximal erreichte Druck protokolliert. Diese Daten und die maximal zulässigen Drücke (Nominaldruck) nach Herstellerangaben (Schott 2000) sind zur Übersicht in Tab.2.1. aufgeführt.

Außendurchmesser	[mm]	7,0	5,0	1,0
Innendurchmesser	[mm]	1,5	1,2	0,1
Aktive Länge	[mm]	35,0	35,0	20,0
Aktives Probenvolumen	[ $\mu\text{l}$ ]	61,9	39,6	0,2
Mittlerer Berstdruck	[MPa]	164	223	280
Maximaler Prüfdruck	[MPa]	400	400	400
Nominaldruck (Schott)	[MPa]	91	86	115

Tab.2.1. Mittlere Berstdrücke und maximal erreichte Drücke der Kapillaren während des Drucktests, sowie maximal zulässiger Druck nach Herstellerangaben (Schott 2000). Zum Vergleich sind die aktiven Probenvolumina angegeben.

Wie Abb.2.1. zeigt, wird Probenflüssigkeit und Druckmedium durch einen Teflonschrumpfschlauch separiert. Das Volumen dieses Schlauches muss so ausreichend bemessen sein, dass bis zum maximalen Druck von 200 MPa keine vollständige Kompression des Schlauches eintritt. Das spezifische Volumen von Wasser verringert sich bei 200 MPa und 25 °C um etwa 7 % gegenüber dem spezifischen Volumen bei Normaldruck (Kell 1972). Vergleicht man dies mit den Probenvolumina in Tab.2.1., wäre selbst bei 7 mm Kapillaren nur ein Schlauch mit 2 mm Länge und 2 mm Durchmesser zum Ausgleich nötig. Beim Abfüllen der Kapillaren im Vakuum sind jedoch Luftblasen unvermeidlich, die zu berücksichtigen sind. Aus praktischen Erfahrungen heraus sollte kein Schlauch kürzer als 20 mm verwendet werden, womit das gesamte notwendige Probenvolumen etwa 140 µl beträgt. Zum Befüllen werden die Kapillaren mit dem offenen Ende des Schlauchs nach unten in eine mit der Probe gefüllte Eppendorfküvette gestellt und in die Vakuumanlage eingebracht. Nach Absaugen der Luft wird beim Wiederbelüften der Vakuumanlage die Probenflüssigkeit in die Kapillare gedrückt. Probleme beim Abfüllen treten durch Siedeverzug und Aufschäumen von stark konzentrierten Proteinlösungen bei zu schnellem Absaugen der Luft auf. Bei Kapillaren mit besonders engem Hals sind dagegen störende Luftblasen nahezu unvermeidlich. Die Reinigung dieser Kapillaren ist ebenfalls nur mit der Vakuumanlage möglich.

## 2.2. Quarzkapillaren und Saphirzellen

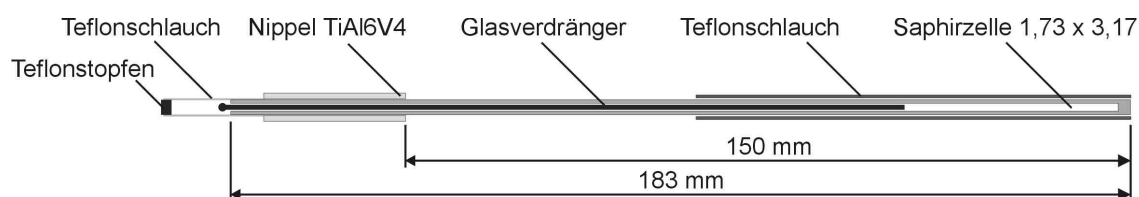


Abb.2.2. Quarzglaskapillare oder Saphirzelle eingeklebt in zylindrischen Titannippel. Die Länge des Nippels ist notwendig, um die Druckkräfte des großen Kapillarquerschnittes aufzufangen.

Wie aus Tab.2.2. ersichtlich ist die Zugfestigkeit von Quarzglas erheblich höher als die von Borosilikatglas, dennoch konnten mit Quarzkapillaren nie so hohe Drücke wie mit Borosilikatglaskapillaren erreicht werden. Der maximale Druck lag bei 170 MPa. Die geringe Druckfestigkeit wird vermutlich durch eine höhere Wahrscheinlichkeit von Fehlstellen im Glas durch das größere Glasvolumen gegenüber den Borosilikatglaskapillaren bedingt.

Als Rohmaterial wurden Rohre mit 3 mm Außendurchmesser und 0,8 mm Innendurchmesser von Heraeus-Quarzglas und der Quarzschmelze Ilmenau verwendet, die an einem Ende verschmolzen und auf der Innenseite geätzt wurden. Trotz des geringen Wärmeausdehnungskoeffizienten von Quarz (Tab.2.2.) wurden die Kapillaren getempert, um Restspannungen zu entfernen. Ein Herstellungsprozess aus größerem Quarzhalbzeug, wie von Yamada et al. (2001) beschrieben, wurde mangels geeigneter Werkstatt-einrichtungen nicht erprobt.

Als Alternative wurden Saphirzellen von Saphikon mit den Abmessungen 3,17 / 1,73 mm eingesetzt, das Ende der Saphirzellen wird bereits verschlossen geliefert. Ohne jegliches Ätzen oder langwierige Abdruckverfahren widerstehen diese Kapillaren 220 MPa. Als Klebstoff zur Verbindung der Saphirzellen mit den Titannippeln wird ebenfalls Eccobond 104 verwendet.

Aus Tab.2.2. ist zu entnehmen, dass der Wärmeausdehnungskoeffizient von Saphir dreimal höher als bei Borosilikatglas liegt. Beim Temperieren besteht deshalb für Saphir erhöhte Bruchgefahr, zumal der Durchmesser der Verklebung viel größer ist als bei den Glaszellen. Der bisher einzige Verlust einer Saphirzelle trat beim Erwärmen nach Tieftemperaturdenaturierungsmessungen auf. Hier muss unter Druck temperiert werden, um ein Einfrieren der Lösung zu verhindern. Dies bedeutet, dass die Kapillaren während der Tieftemperaturdenaturierung einer doppelten Belastung durch thermische und mechanische Spannungen standhalten müssen. Die Ursache der Zerstörung der Kapillare durch spontane Kristallisation, thermische Spannungen oder Materialermüdung konnte nicht ermittelt werden. Für NMR-Messungen an wässrigen Lösungen von Proteinen sollte die Suszeptibilität  $\chi$  des Probenbehälters der von Wasser  $\chi = -0,72 \cdot 10^{-6}$  (Wilmaad 1998) entsprechen, um Inhomogenitäten des Magnetfeldes durch Brechung der Feldlinien an den Grenzflächen zwischen Probe, Druckkapillare und den Schutzeinrichtungen gegen Explosion zu vermeiden. Borosilikatgläser (Pyrex) kommen dieser Forderung sehr nahe, Saphir weicht weiter ab, die Messergebnisse weiter unten belegen jedoch eine ausreichende Feldhomogenität für Saphir, die zu keiner inakzeptablen Verbreiterung der Linien führt.

	Borosilikatglas	Quarzglas	Saphir	
Hersteller	Schott	Qsil	Saphikon	
Zugfestigkeit [Nmm <sup>-1</sup> ]	7	50	140	
Ausdehnungskoeff. [10 <sup>-6</sup> °C <sup>-1</sup> ]	3	0,5	8,8	7,9
Verarbeitungstemp. [°C]	825-1260	1700-2100	> 2053	
Magn. Suszeptibilität [10 <sup>-9</sup> m <sup>3</sup> kg <sup>-1</sup> ]	<sup>a</sup> -0,86	<sup>b</sup> -0,49	-0,21	-0,25

Tab.2.2. Relevante physikalische Eigenschaften von Borosilikatglas (Schott 2000), Quarzglas (QSIL 1997) und Saphir (Saphikon 2001). Angegeben sind jeweils Daten des Herstellers, <sup>a</sup>Wilmaad (1998), <sup>b</sup>CRC Handbook of Chemistry and Physics (Lide 2000). Ausdehnungskoeffizient und Suszeptibilität sind beim Saphireinkristall tensorielle Größen, links die Werte parallel zur Hauptachse rechts senkrecht dazu.

### 2.3. Vergleich der Qualität der Spektren in Hochdruckkapillaren

Die Saphirzellen bieten gegenüber den Glaszellen das doppelte Probenvolumen. Durch den geringeren Außendurchmesser des Systems können Hochdruckmessungen nun auch in 5 mm Probenköpfen durchgeführt werden, was sich durch Erhöhung des Füllfaktors positiv auf die Signalqualität auswirkt.

Um den Einfluß der Kapillare sichtbar zu machen, wurden am DRX 600 Spektrometer Vergleichsmessungen mit <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC Spektren des Proteins *TmCsp* durchgeführt. Die NMR-Probe enthielt 0,5 mM Protein *TmCsp*, in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,5), 20 mM NaCl, 0,2 mM Na-EDTA, 0,1 µM NaN<sub>3</sub>, 10% D<sub>2</sub>O und 90 % <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O. Zunächst wurde die Probe in der Saphirzelle vermessen, dann wurde das Probenmaterial in eine Glaskapillare mit 5 mm Außen- und 1 mm Innendurchmesser umgefüllt. Die Glaskapillare war vergleichbar dem Typ, der bei allen vorhergehenden Messungen des Proteins *TmCsp* eingesetzt wurde.

Die Speichertiefe der <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC Spektren betrug 2048 Punkte in der direkten Dimension ( $\omega_2$ ) und 256 Zeilen in der indirekten Dimension ( $\omega_1$ ) bei einer Messzeit von 2,5 Stunden. Die Temperiereinheit wurde auf 303 K eingestellt. Abb.2.3. und Abb.2.4. zeigen die Ergebnisse der Vergleichsmessungen. Deutlich sichtbar ist der Qualitätsunterschied der in der Saphirzelle aufgenommenen Spektren (links), zu den in der herkömmlichen Glaszelle gemessenen Spektren (rechts). Diverse Signale sind in der Glaszelle nur noch schwer, oder gar nicht mehr zu

erkennen. Im Spektrum der Glaskapillare (Abb.2.4.rechts) wird bereits das Untergrundrauschen sichtbar. Das Signal zu Rauschverhältnis (S/N) wurde in 1D-Ausschnitten der 2D-Spektren am Beispiel der Seitenkettenprotonen der Aminosäure W29 ausgemessen. Abb.2.5. zeigt die beiden 1D-Spektren. Die Verbesserung des S/N durch die Saphirzellen beträgt etwa den Faktor zwei.

Neben dem erhöhten Probenvolumen ist auch die Linienbreite der Signale entscheidend. In beiden Fällen ist es möglich ohne Teflon Schutzumhüllung Linienbreiten  $< 2$  Hz (mit Teflonschlauch  $< 3$  Hz) zu erreichen. Vorteilhaft für die Saphirzellen ist, dass der Auslauf am verschlossenen Ende der Kapillaren kürzer ( $\approx 3$  mm) ist als bei den Glaszellen ( $\approx 6$  mm) und somit der zylindrische Teil der Kapillaren weiter über den eigentlichen Messbereich des Probenkopfes hinausragt. Dies trägt positiv zur Homogenität des Magnetfeldes bei und verringert die Linienbreite der Signale.

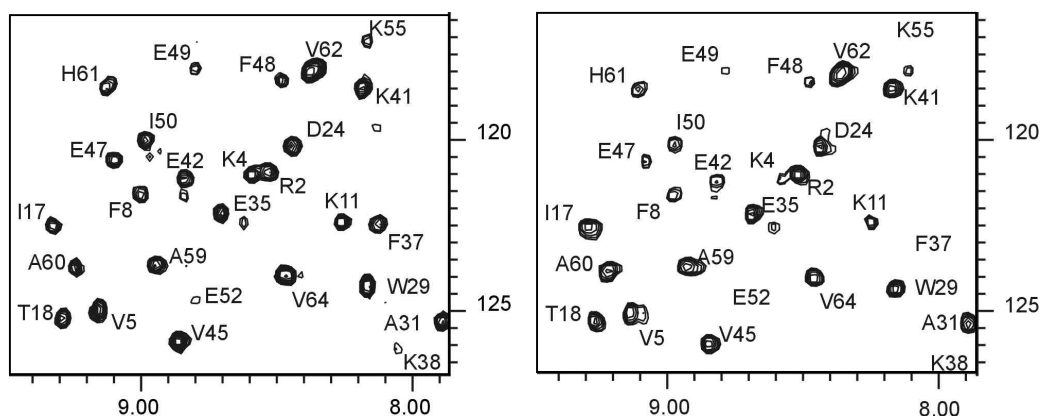


Abb.2.3.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von *TmCsp*. In der Saphirzelle (links) sind Signale wie K38, E52 oder K55 gerade noch sichtbar, während diese im Spektrum mit Glaskapillare (rechts) (innen 1,2 mm / außen 5 mm) fehlen.

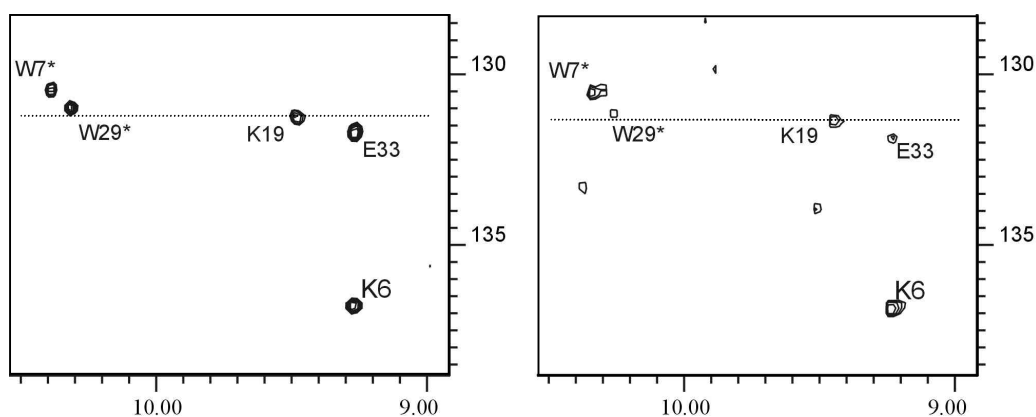


Abb.2.4.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Vergleichsmessung von *TmCsp* in Saphirzelle (links) und Glaskapillare (rechts). Links sind die Signalintensitäten wesentlich stärker als rechts, zusätzlich wird rechts schon der Rauschuntergrund sichtbar. Die gestrichelten Linien zeigen die Lage der in Abb.2.5. dargestellten Spektren.

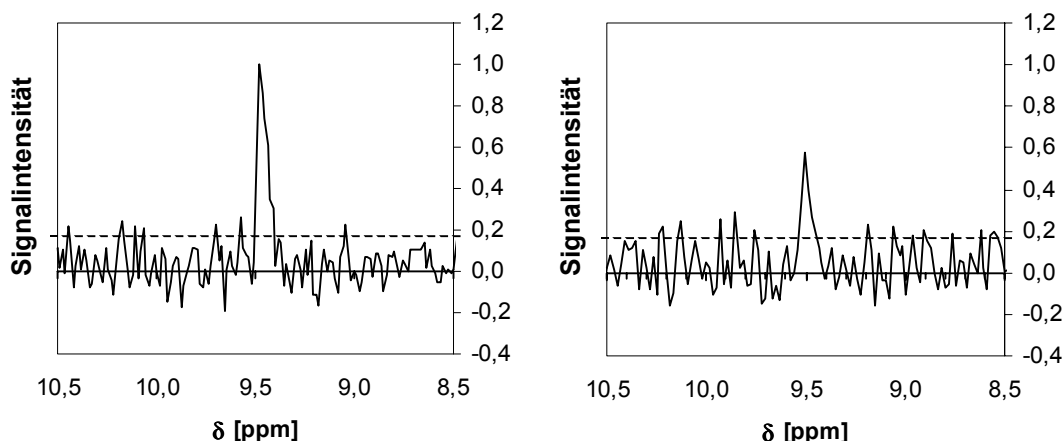


Abb.2.5. 1D-Ausschnitte aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von *TmCsp* in Saphirzelle (links) und Glaskapillare (rechts). Das Signal zu Rauschverhältnis ist in der Saphirzelle etwa um den Faktor zwei verbessert, der Pegel des Rauschuntergrunds ist gestrichelt eingezeichnet. Durchmesser der Saphirzellen : innen 1,7 mm / außen 3,2 mm  
Durchmesser der Glaskapillare : innen 1,2 mm / außen 5,0 mm

## 2.4. Hochdruckeinsätze für Bruker DRX600 und DMX500

Der Anschluss der Kapillaren an die Hochdruckleitung erfolgt mit Hilfe eines Autoklavs, der die Übertragung des Drucks von der Hydraulikflüssigkeit auf die Probenflüssigkeit ermöglicht (Abb.2.6.). Für Borosilikatglaskapillaren und Saphirzellen existieren zwei verschiedene Autoklaven, die in den Außenabmessungen identisch sind. Beide Autoklaven sind daher voll kompatibel zu den übrigen Bauteilen des Hochdrucksystems, die zur exakten Positionierung der Probe im Spektrometer benötigt werden.

Für Borosilikatglaskapillaren wird die bewährte Metallkonusdichtung verwendet. Die Öffnungswinkel der Konen von Nippel und Autoklav sind mit  $59^\circ$  und  $60^\circ$  unterschiedlich ausgeführt, um eine schmale Dichtkante zu erhalten. Zusätzliches Dichtmaterial ist nicht notwendig. Radiale Druckkräfte auf das eingeklebte Glasteil können aufgrund des geringen Durchmessers des Kapillarenhalses im Verhältnis zum Durchmesser der dichtenden Metallflächen vernachlässigt werden. Die Verwendung einer reinen Metalldichtung, ohne flexible Dichtelemente wie O-Ringe oder Teflonscheiben, erlaubt den Einsatz bis zu höchsten Drücken über 400 MPa.

Anders sind die Verhältnisse bei den Saphirzellen, deren Durchmesser im Bereich des Nippels mehr als dreimal größer als bei den Glaskapillaren ist. Hier würden bei Verwendung der Metallkone zur Abdichtung die radialen Kräfte beim Einschrauben der Kapillaren in den Hochdruckautoklaven zu einer elastischen Verformung des Nippels und damit zur Zerstörung der Kapillaren führen. Daher wird hier die Dichtung mit O-Ringen bewerkstelligt, die keine nennenswerten radialen Kräfte auf die Kapillaren ausüben und zusätzlich die Dichtwirkung aktiv durch zunehmenden Druck verbessert. Zur anfänglichen Dichtung bei Normaldruck wird der O-Ring durch leichtes Anziehen der Verschlusschraube von einem Messingring mit leicht konischer Endfläche in den Spalt zwischen Nippel und Autoklavenwand gedrückt. Voraussetzung für die Funktion des Systems ist ein schmaler Spalt von wenigen  $\mu\text{m}$ . Bei höheren Drücken als 200 MPa ist damit zu rechnen, dass sich das flexible Material des O-

Rings in den Spalt zwischen Titannippel und Autoklavenwand presst und zu einem Festsetzen der Kapillare führt.

Die Druckfestigkeit eines dickwandigen Zylinders ergibt sich mit Gl.2.1. aus der Scherfestigkeit  $\tau$  des Materials und dem Quotienten  $K$  von Außenradius durch Innenradius. (Sherman & Stadtmüller 1987). Die Scherfestigkeit ist annähernd halb so groß wie die Zugfestigkeit  $\sigma$ , die bei der verwendeten Titanlegierung TiAl6V4 (TIKRUTAN LT31, Deutsche Titan) 1000-1200 MPa beträgt. Zur Berechnung des Berstdrucks muss die Scherfestigkeit  $\tau$  zusätzlich mit  $3^{-0,5}$  multipliziert werden, da nur bis zu dieser Belastung  $\tau^*$  elastische Verformungen möglich sind (Sherman & Stadtmüller 1987). Berücksichtigt man dies, so kommt man für den Autoklaven der Saphirzellen (Abb.2.7.) auf einen Berstdruck von  $p_{max} = 550$  MPa (Innenradius 3 mm / Außenradius 8 mm) und für den Autoklaven der Borosilikatglaskapillaren auf  $p_{max} = 850$  MPa (Innenradius 1,75 mm / Außenradius 8 mm). Die Wandstärken beider Autoklaven sind damit für die mit den vorhandenen Mitteln erreichbaren Drücke ausreichend bemessen.

$$p_{max} = \tau^* \ln(K^2) \quad (Gl.2.1.)$$

Zum Einsatz im Spektrometer wird die Einheit aus Autoklav und Kapillare in den Probenrohrhalter eingeschraubt. Für die verschiedenen Probenköpfe mit 5 mm, 8 mm und 10 mm wurden drei verschiedene Probenrohrhalter (Abb.2.10-Abb.2.12.) hergestellt. Zum Schutz des Probenkopfes vor möglichen Explosionen der Borosilikatglaskapillaren dient ein Standard NMR-Glasprobenrohr und zusätzlich eine Teflonhülse um die Glaskapillare (Abb.2.9.).

Die gleiche Sicherung kann für die Saphirzellen verwendet werden, wenn der Probenkopf einen Innendurchmesser von mindestens 8 mm aufweist. Für 5 mm Probenköpfe muss auf das Glasschutzrohr verzichtet werden, da der Abstand zwischen Saphirzelle und Glaswand zu gering ist, sodass trotz Teflonschutzhülle das Glasrohr mit beschädigt wird und zu weiteren Schäden im Probenkopf führt. Damit trotzdem keine Druck- oder Probenflüssigkeit in den Messkopf bei Explosionen eindringt, wird die von einem Teflonschlauch fest umgebene Saphirzelle mit einem Stück Silikonschlauch im Probenrohrhalter gesichert.

Eine präzise Justierung der Höhenlage der Kapillaren im Probenkopf ist durch Aufschrauben des Probenrohrhalters auf den Autoklav möglich, dessen Außenabmessungen dem für Messungen unter Normalbedingungen verwendeten „Spinner“ entsprechen. Die Lage des Probenkopfhalters auf dem Autoklaven wird durch eine Rändelmutter (Abb.2.9.) fixiert. Um eine genaue axiale Ausrichtung der ganzen Apparatur im Spektrometer zu gewährleisten, wird der Probenkopfhalter in das Einsatzrohr (Abb.2.13.) eingeschraubt und mit dem Zentrierring am oberen Ende des Spektrometers gegen Verkippen gesichert. Die Position des gesamten Hochdrucksystems relativ zum Probenkopf ist damit gut fixiert.

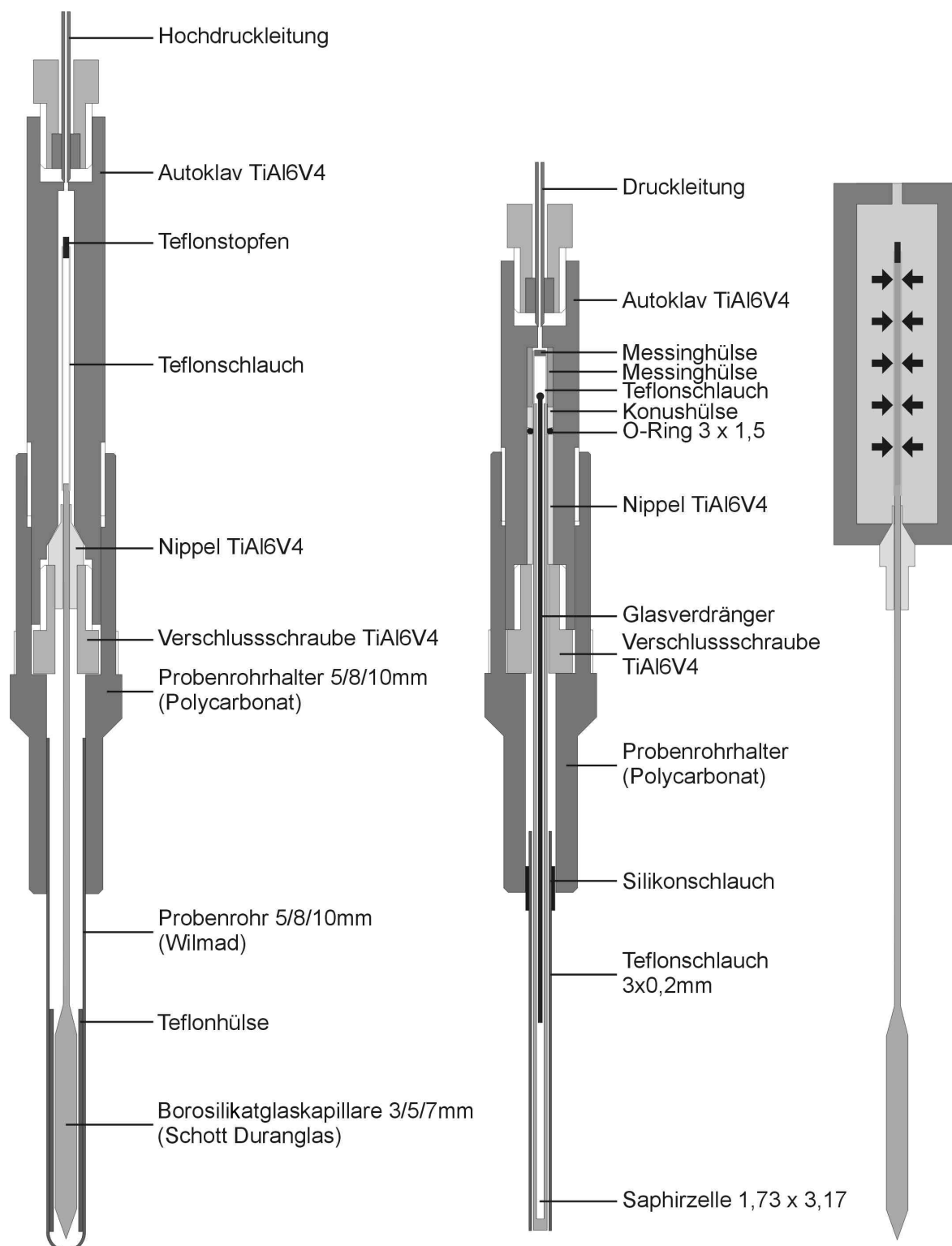


Abb.2.6. Links: Hochdruckautoklav für Borosilikatglaskapillaren, Mitte: Autoklav für Saphirzellen, zur Reduzierung des notwendigen Probenvolumens in den Saphirzellen dient ein Glasstab als Verdränger. Rechts: Funktionsprinzip. Zur Übertragung des Drucks auf die Probe dient in beiden Fällen ein Teflonschlauch, der die Vermischung von Hydraulik- und Probenflüssigkeit verhindert.



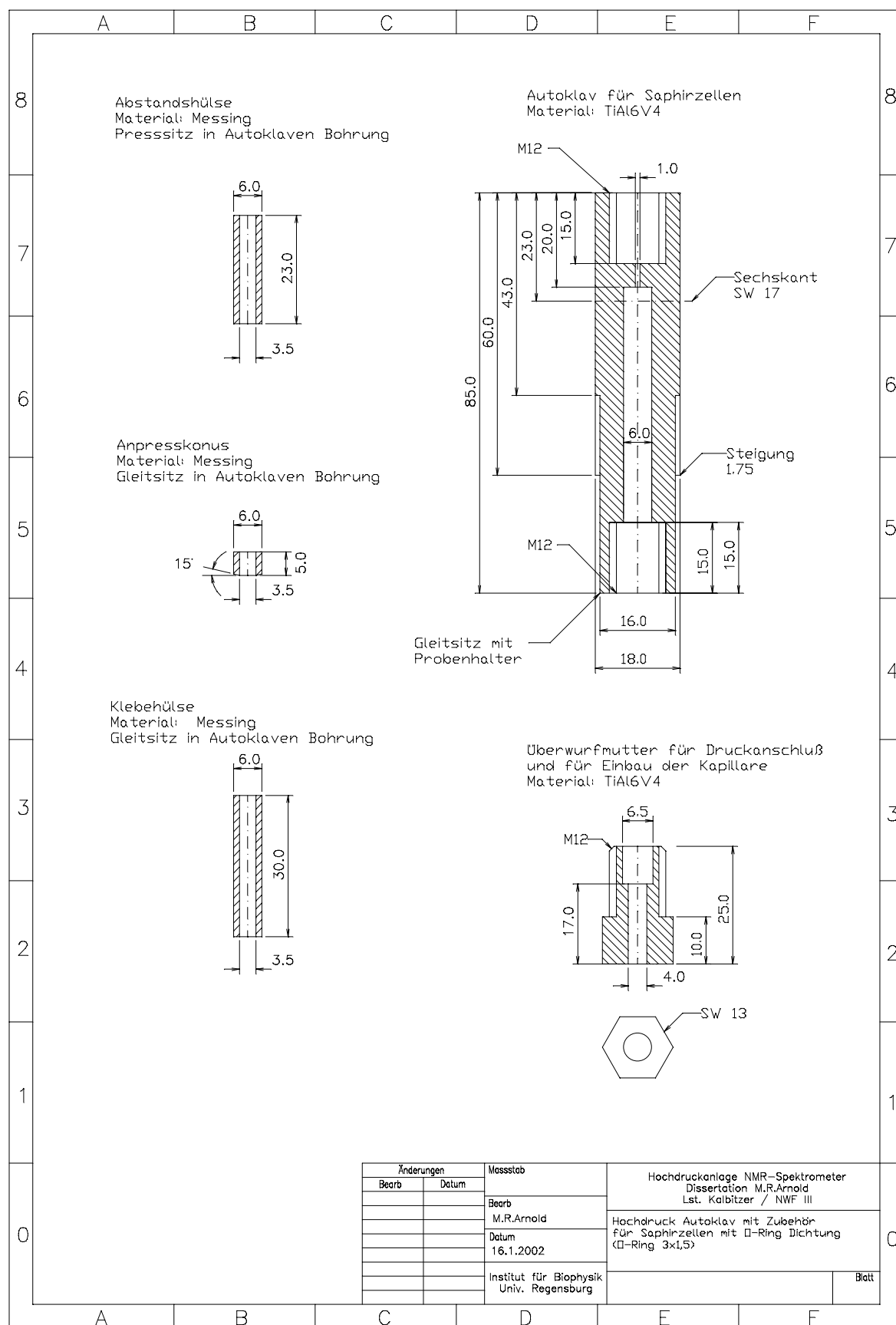


Abb.2.7. Kompletter Satz der Bauteile des Hochdruckautoklaven zur Verwendung der Saphirzellen mit O-Ring Dichtung. Die Abstandshülse wird fest in den Autoklaven eingepresst.

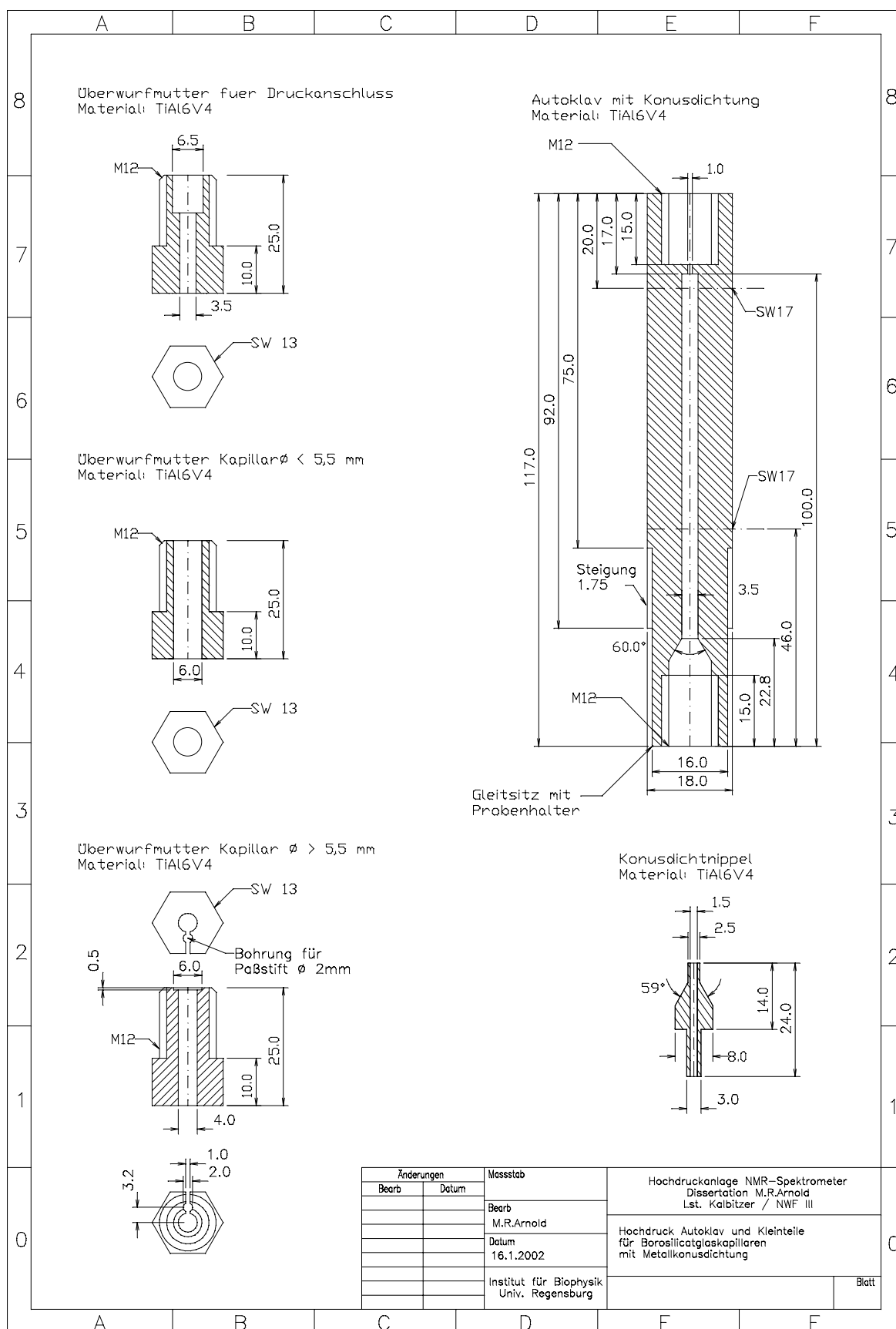


Abb.2.8. Kompletter Satz der Bauteile für den Hochdruckautoklaven zur Verwendung der Borosilikatglaskapillaren mit Titandichtnippel.

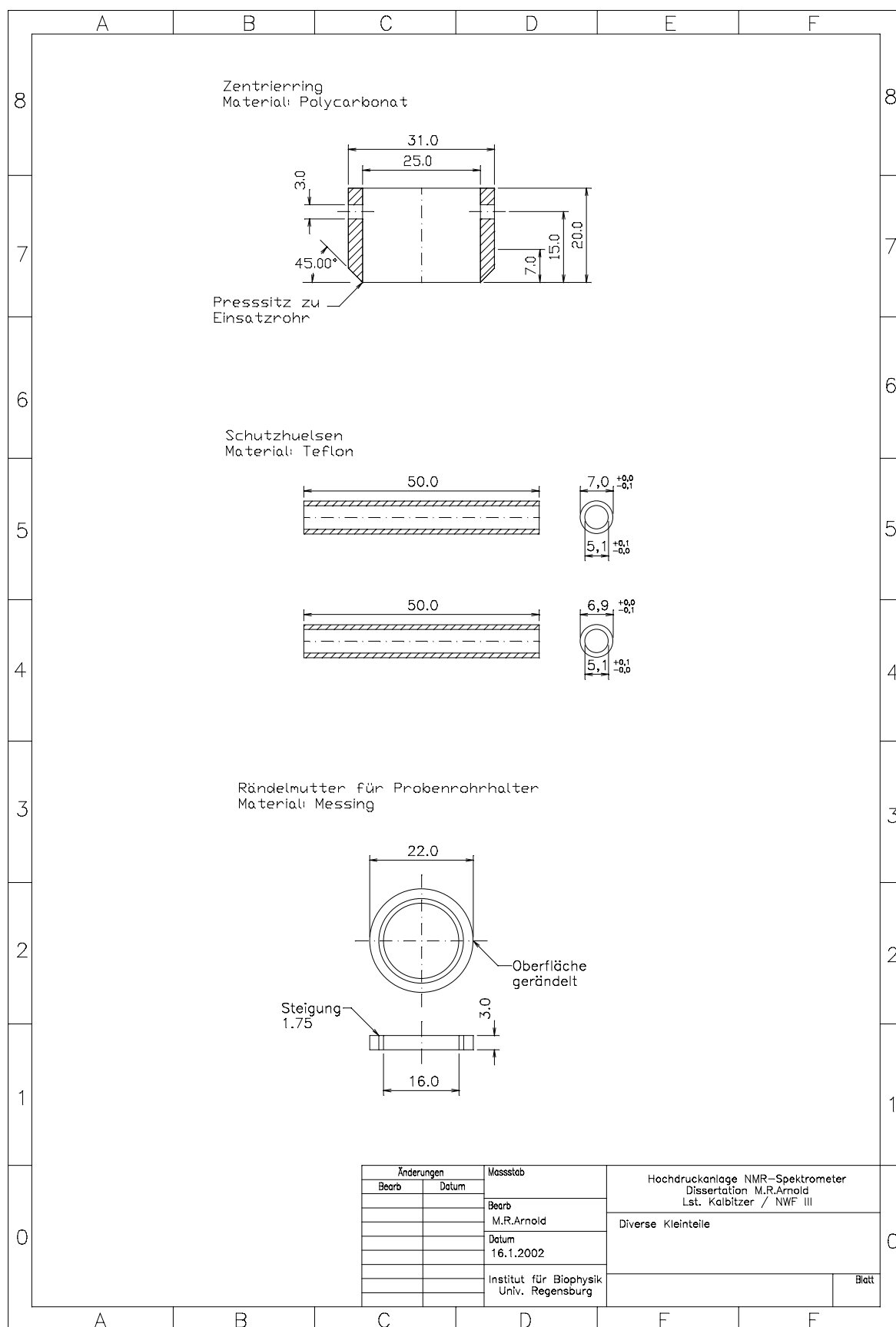


Abb.2.9. Der Zentriering dient zur koaxialen Ausrichtung des Hochdruckeinsatzes in der Bohrung des Spektrometers, die Schutzhülsen verhindern Schäden durch Glaskapillaren. Mit dem Feststellring wird die Kapillarenposition im Spektrometer festgelegt.

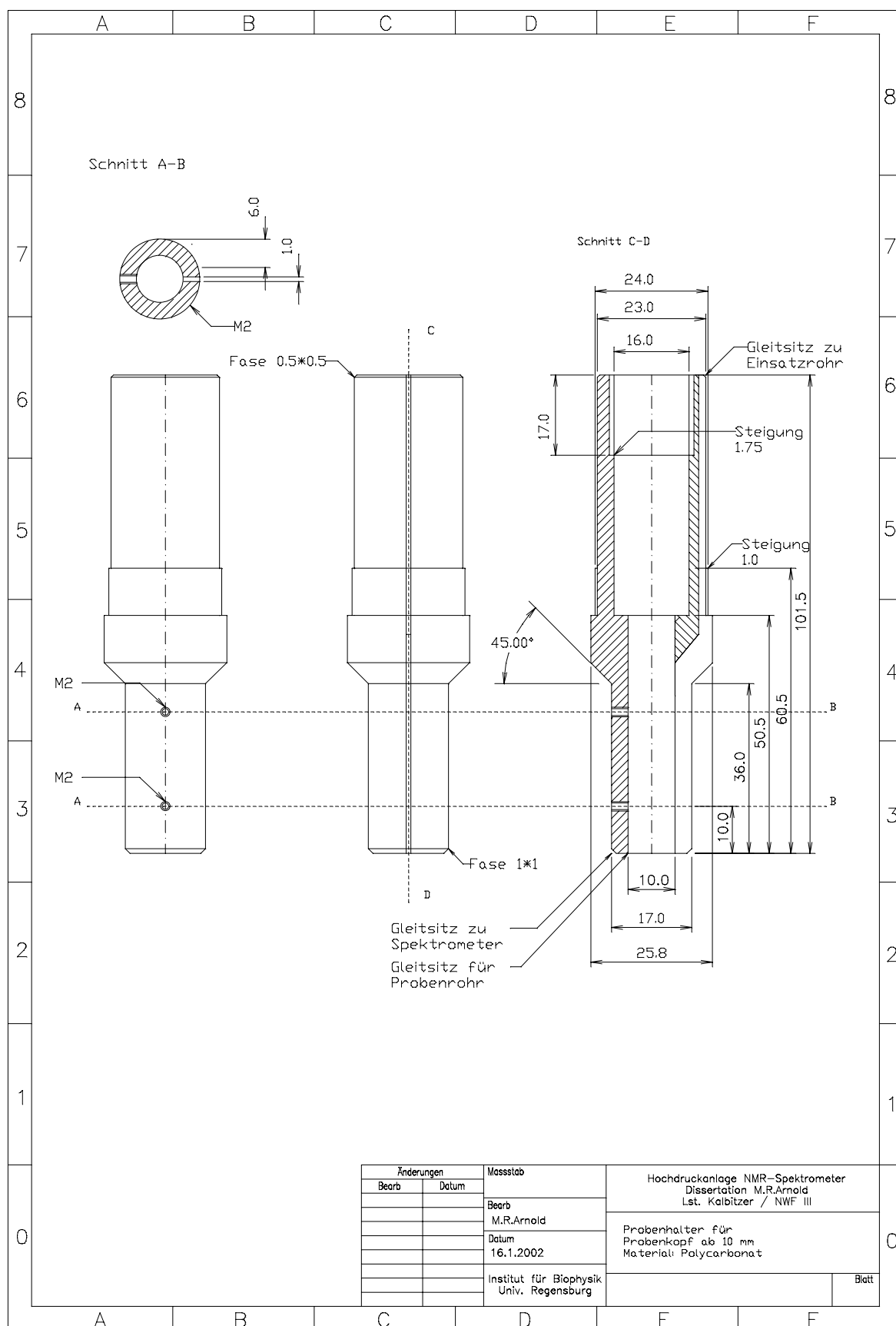


Abb.2.10. Halter für Probenrohre mit 8 mm Außendurchmesser zur Verwendung mit beiden Hochdruckautoklaven. Das Probenrohr wird durch Anziehen zweier Madenschrauben aus Messing oder Teflon geklemmt..

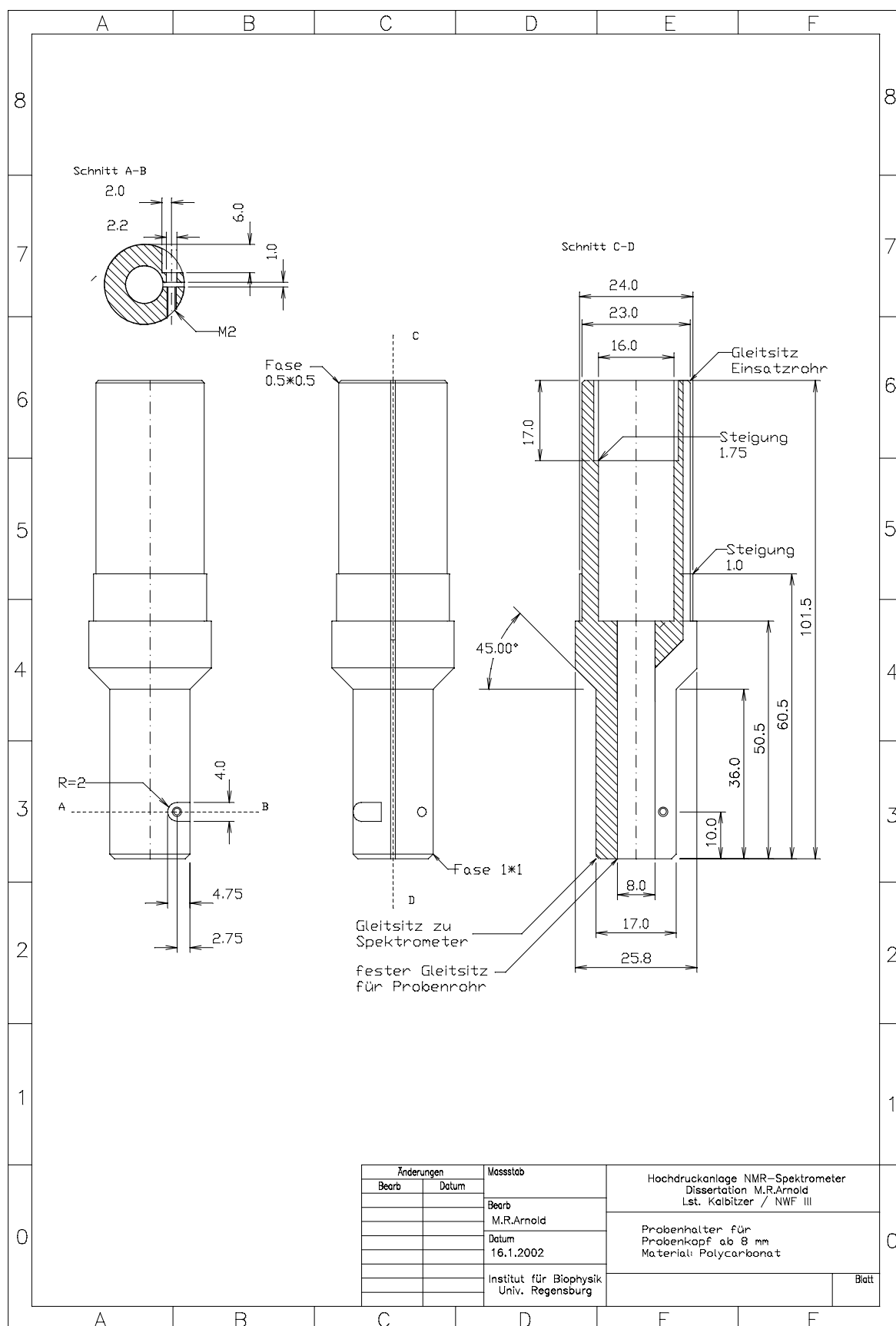


Abb.2.11. Halter für Probenrohre mit 8 mm Aussendurchmesser zur Verwendung mit beiden Hochdruckautoklaven. Das Probenrohr wird durch Festziehen einer Messingschraube wie in einer Spannzange festgeklemmt. Der Längsschlitz dient zum Einführen eines Thermoelements in den Messbereich.

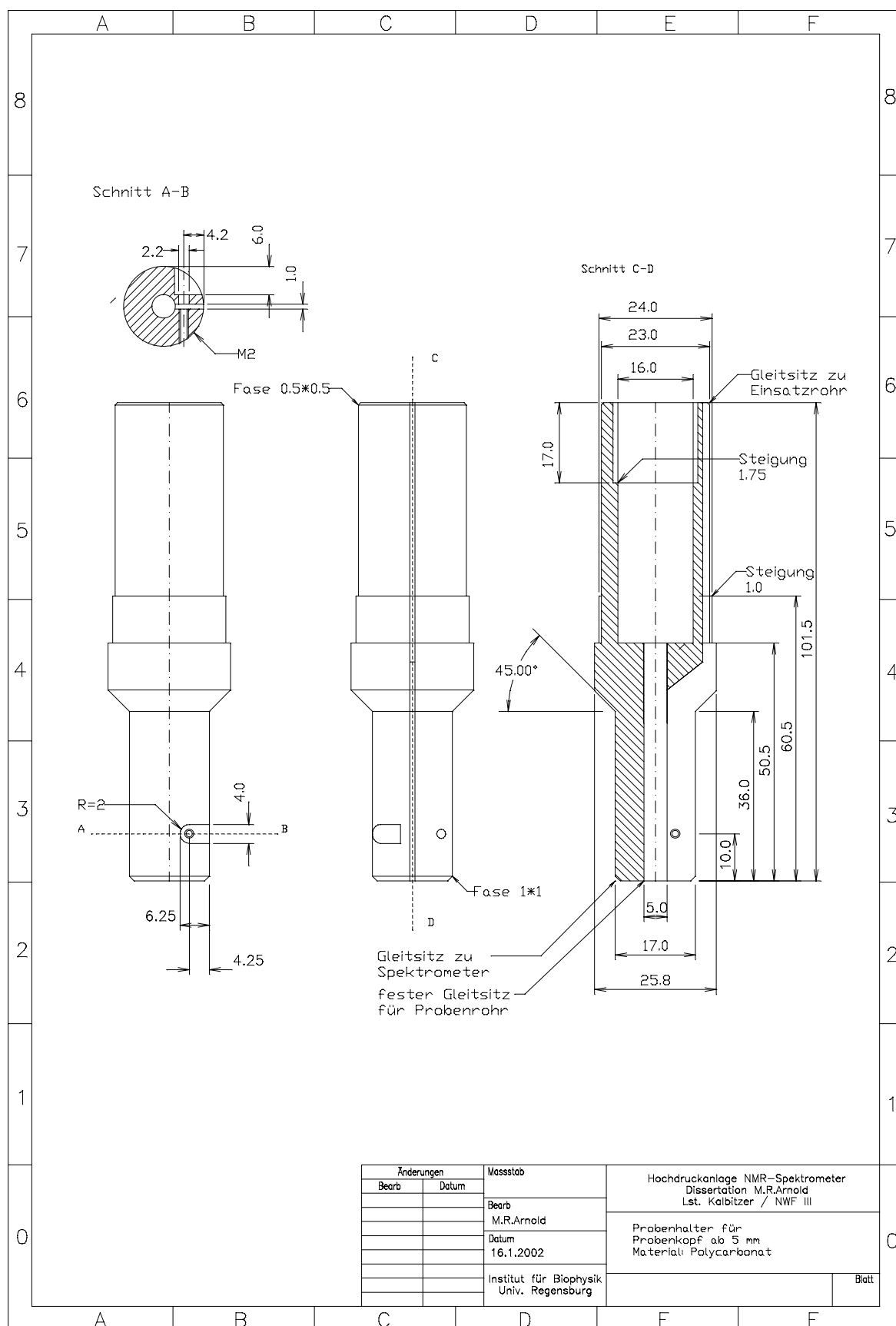


Abb.2.12. Probenrohrhalter für Glasrohre mit 5 mm Außendurchmesser, zur Verwendung mit beiden Hochdruckautoklaven. Das Probenrohr wird durch Festziehen einer Messing Schraube wie in einer Spannzange festgeklemmt.

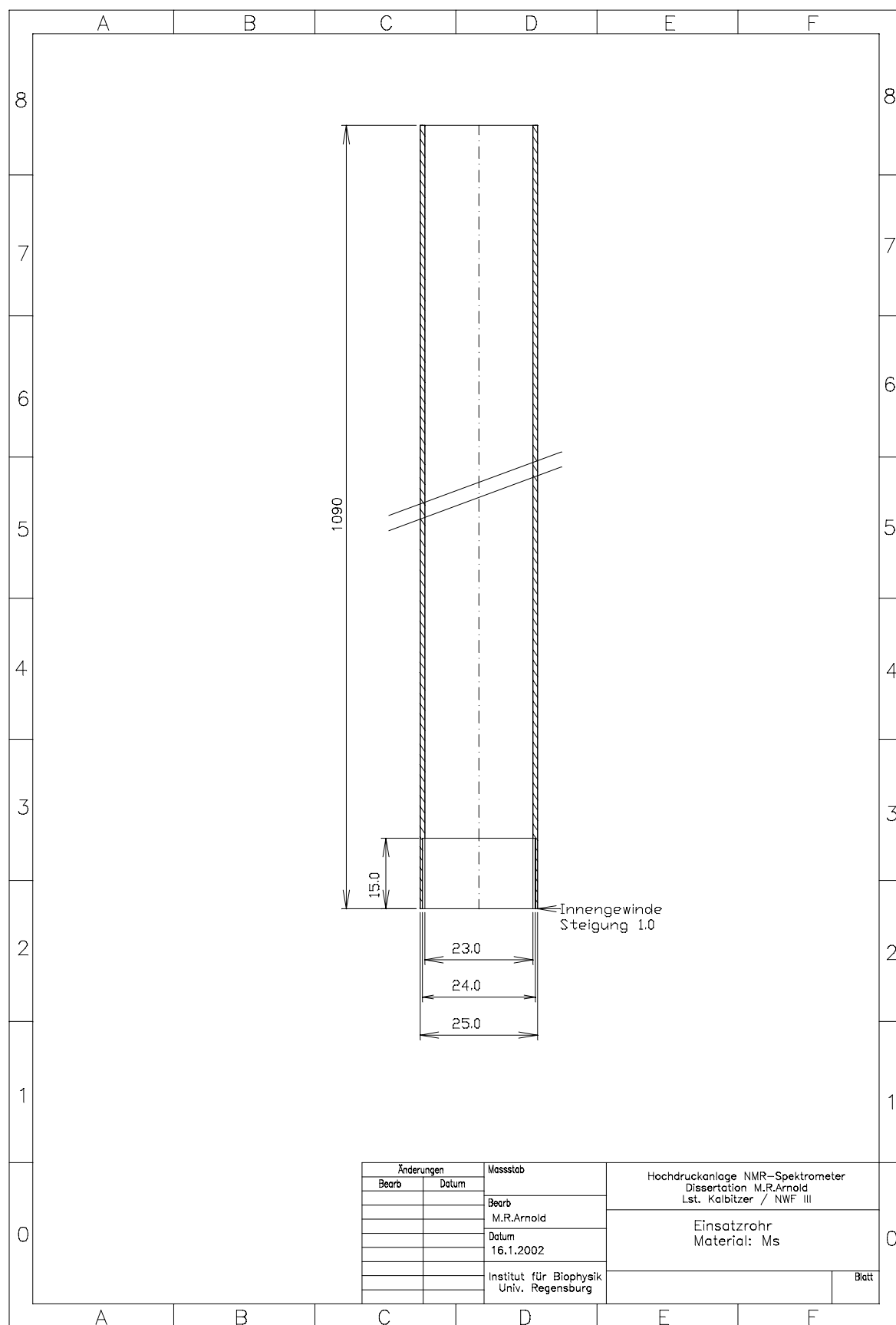


Abb.2.13. Messingrohr zum Einsetzen der kompletten Hochdruckapparatur in das Spektrometer. In das am unteren Ende befindliche Gewinde werden die Probenrohrhalter eingeschraubt. Das Rohr gewährleistet mit dem Zentrierring aus Abb.2.9. die koaxiale Ausrichtung der Apparatur im Spektrometer.

## 2.5. Die Druckbank mit Spindelpresse

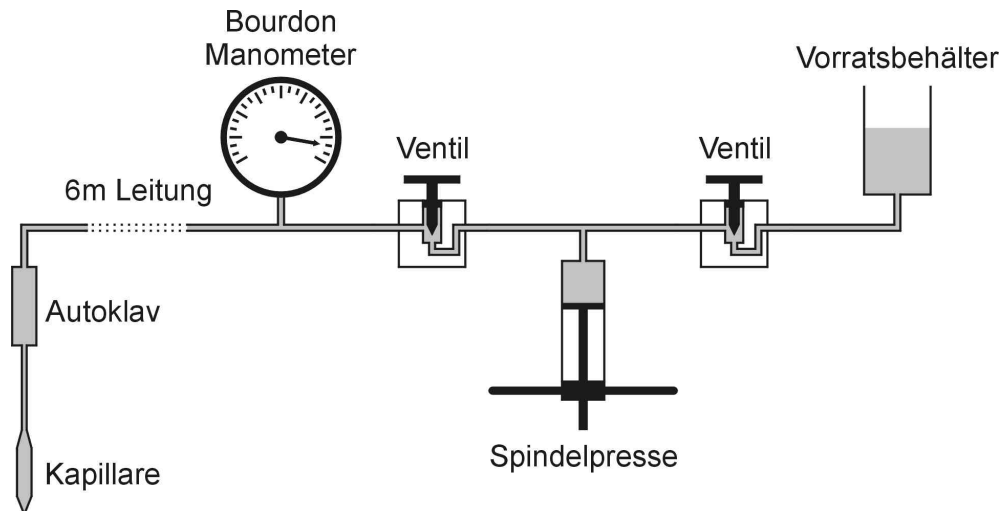


Abb.2.14. Druckbank mit Spindelpresse, Bourdonmanometer und Absperrventilen zur Hochdruckmessung bis 400 MPa (Hauer 1981). Um eine Drift des Drucks durch Undichtigkeiten der Spindelpresse zu vermeiden, sollte das linke Ventil während der Messung geschlossen bleiben.

Alle Experimente wurden mit einer handbetriebenen Spindelpresse für Drücke bis 400 MPa ausgeführt wie sie z.B. in der Dissertation von Hauer 1981 beschrieben wird. Druckflüssigkeit ist Methylcyclopentan und Methylcyclohexan im Verhältnis 1:1, das in einem weiten Druck- und Temperaturbereich flüssig bleibt. Die Messung des Drucks erfolgte durch ein Bourdonmanometer der Genauigkeitsklasse 0,1 entsprechend einem Messfehler von  $\pm 6$  MPa, direkt an der Druckbank. Zum Spektrometer führte eine ca. 6 m lange Kapillare aus hochfestem nicht ferromagnetischem Stahl mit Innendurchmesser 0,1 mm. Eine Überwachung des Drucks unmittelbar an der Kapillare ist nicht möglich. Zur Einstellung des Druckgleichgewichts wurde eine ausreichende Zeitspanne zwischen den Messungen abgewartet, um die Einstellung eines thermischen Gleichgewichts zu erreichen. Zur Vermeidung von Druckverlusten durch Lecks der Spindelpresse und zur Reduktion der nachfließenden Flüssigkeitsmenge im Fall eines Bruchs der Kapillare im Spektrometer, wurde die Spindelpresse über ein Nadelventil vom Rest des Aufbaus während der Messung abgetrennt.

Eine Automatisierung der Druckbank scheiterte an der zu großen Selbsthemmung des Trapezgewindes zur Verschiebung des Druckkolbens und an permanenten Undichtigkeiten des Kolbens. Ein Umbau mit Kugelumlaufspindel wäre mit zu großem Zeitaufwand in der Werkstatt verbunden gewesen und hätte das Problem der Leckagen nicht gelöst. Da die im Folgenden beschriebene Drucksprüngeinrichtung auch dazu geeignet ist, statische Drücke zu liefern, wurden die Arbeiten an der Spindelpresse eingestellt.



## 2.6. Die automatische Druckbank mit Drucksprungeinrichtung

Bei statischer Änderung des Drucks auf Proteinproben verschiebt sich das Gleichgewicht verschiedener Faltungszustände der Proteine zu einer mittleren Struktur, die gegenüber der mittleren Struktur bei Normaldruck verschieden ist. Vernachlässigt man sehr lang andauernde Vorgänge struktureller Umwandlungen, wie Aufbrechen von Disulfidbrücken oder Prolin cis-trans-Isomerisierung, so ist keine Information über das zeitliche Verhalten der Umstrukturierung aus den statischen Hochdruckmessungen zu erhalten. Um dieses Informationsdefizit auszugleichen, wurde eine Drucksprungeinrichtung aufgebaut.

Im einfachsten Fall kann der Drucksprung in 1D-Spektren angewendet werden. Hier ergeben sich durch zeitliche Variation der Lage des Drucksprungs relativ zum 90°-Hf-Puls verschiedene Spektren. Aus Linienverbreiterungen, oder dem Vergleich der Signalvolumina bei getrennten Linien des Proteins im druckdenaturierten Zustand und im nativen Zustand bei Normaldruck, kann die Geschwindigkeitskonstante lokaler Umfaltungen bestimmt werden. Ein analoges Experiment wurde von Akasaka et al. (2001) für Temperatursprünge durchgeführt.

Zur Anwendung des Temperatursprungs in 2D-Experimenten setzte Akasaka et al. (2001) eine NOESY-Pulsfolge ein (Abb.2.15.), die in gleicher Weise auch für den Drucksprung verwendet werden kann.

Das NOESY Experiment zur Drucksprungeinrichtung besteht aus drei aufeinander folgenden 90° Pulsen in den Abständen  $t_1$ ,  $\tau_p$  und  $t_2$ . Durch den ersten 90°-Puls wird die z-Komponente der Magnetisierung in die xy-Ebene transferiert. Hier evolvieren die Kernspins der Proteinprobe entsprechend ihren unterschiedlichen  $T_2$ -Relaxationsraten im nativen Faltungszustand. Nach der Zeit  $t_1$  wird die Projektion der Transversalmagnetisierung auf die y-Achse vom zweiten 90°-Puls in die negative z-Richtung gedreht, gleichzeitig führt der Drucktransient das Protein in den denaturierten Zustand über. Die Magnetisierungskomponenten in z-Richtung tauschen nun während der Zeit  $\tau_p$  Magnetisierung aus, bis der dritte 90° Puls die Spins in die xy-Ebene zur Beobachtung während der Zeit  $t_2$  zurückführt. Während des Experiments wird die Evolutionszeit  $t_1$  inkrementiert, alle anderen Zeiten bleiben konstant. Die zweidimensionale Fouriertransformation nach den Zeiten  $t_1$  und  $t_2$  ergibt Spektren gemäß Abb.2.15. in denen Kreuzsignale die Verbindung zwischen Signalen im nativem und denaturiertem Zustand herstellen. Ähnlich einem Austauschexperiment wird der Zusammenhang verschiedener Signale deutlich. Da hier jedoch die Zustände unmittelbar nach dem Zustandswechsel registriert werden, ist mit dem Auftreten sonst nicht beobachtbarer Signale kurzlebiger Faltungsintermediate in den Spektren zu rechnen, die mit statischen Druckexperimenten nicht beobachtbar wären. Diese Aussagen wurden von Akasaka et al. (2001) für den Temperatursprung bereits experimentell belegt.

Im Gegensatz zum Temperatursprung ist der Drucksprung jedoch flexibler in der Anwendung. Während beim Temperatursprung die Probe selbst durch Mikrowellen schnell erhitzt werden kann, ist die Abkühlung durch den Kühlluftstrom um die Probe und die Wärmeleitfähigkeit von Probenrohr und Probe begrenzt. Das bedeutet, dass immer nur der Übergang von nativen in den denaturierten Zustand beobachtet werden kann. Die Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung bleiben zwangsläufig verborgen. Beim Drucksprung ist man flexibler, da dieser in beiden Richtungen gleich schnell ablaufen kann und je nach Ausführung der Druckstoßeinrichtung steilere und zeitlich genauer festlegbare Transienten erlaubt.

Wie bei allen NMR-Hochdruckmessungen bedingt das geringe Probenvolumen die Akkumulation vieler Einzelexperimente, sodass alle Komponenten der Druckanlage eine ausreichende Belastbarkeit und Wiederholgenauigkeit gewährleisten müssen.

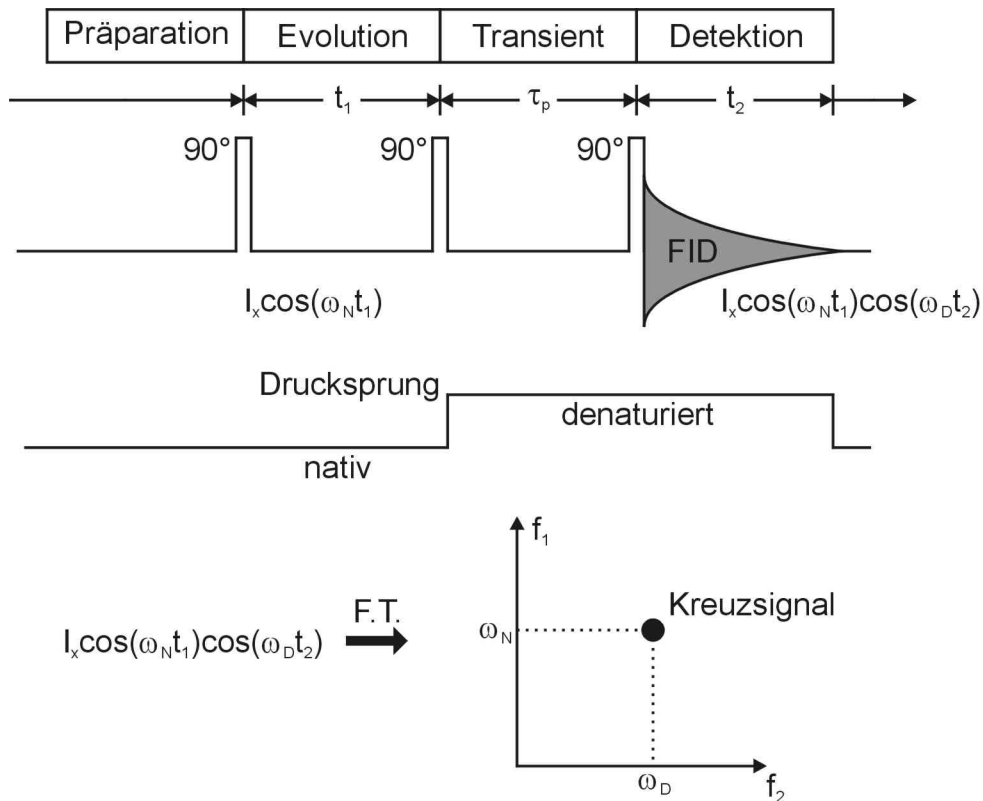


Abb.2.15. Das 2D-Drucksprungexperiment basiert auf einer NOESY-Pulsfolge. Der erste  $90^\circ$  Puls transferiert die Magnetisierung in die xy-Ebene. Während der Evolutionszeit  $t_1$  entwickeln sich die Spins im nativen Zustand des Proteins, bis der zweite  $90^\circ$  Puls die y-Komponenten der Magnetisierung auf die z-Achse klappt. Gleichzeitig wird das Protein durch den Drucktransienten in den denaturierten Zustand übergeführt, in dem die Magnetisierung während der Zeit  $\tau_p$  zwischen den Spins ausgetauscht wird. Der letzte  $90^\circ$  Puls bringt die Magnetisierung zur Detektion in die xy-Ebene. Zweimalige Fouriertransformation nach  $t_1$  und  $t_2$  ergibt ein Kreuzsignal zwischen Signalen des denaturierten und nativen Zustandes (modifiziert nach Akasaka et al. 2001)

### 2.6.1. Die Kompressibilität von Wasser

Zur Auslegung der Drucksprüngeinrichtung muss der Verlauf der Kompressibilität von Wasser bekannt sein. Das spezifischen Volumen von Wasser ist bei Kell (1972) zu finden, Tab.2.3. zeigt davon den hier relevanten Bereich von Normaldruck bis 400 MPa, der Verlauf ist schwach nichtlinear wie in Abb.2.16. zu erkennen ist. Mit Hilfe der linearen Näherung Gl.2.2., die aus den Daten von Tab.2.3. bestimmt wurden, kann das Volumen  $V(p)$  unter dem Druck  $p$  [MPa] eines gegebenen Ausgangsvolumens  $V_0$  errechnet werden. Die zwangsläufig auftretende Kompressionswärme wird hier nicht berücksichtigt.

$$V(p, T = 25^\circ \text{C}) \approx - 2,96 \cdot 10^{-4} p V_0 \quad (\text{Gl.2.2.})$$

p [MPa]	spez.Volumen (25 °C)
50	0,9819
100	0,9634
150	0,9471
200	0,9341
250	0,9218
300	0,9106
350	0,9002
400	0,8906

Tab.2.3. Das spezifische Volumen von Wasser bei 25 °C von Normaldruck bis 400 MPa (Kell 1972).

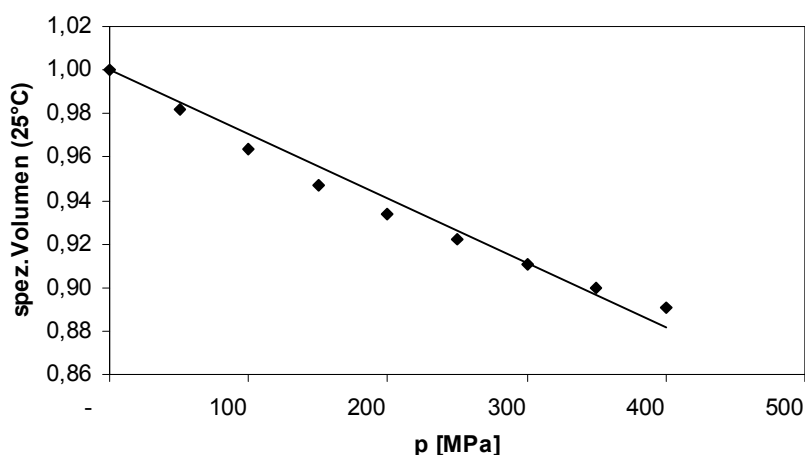


Abb.2.16. Das spezifische Volumen von Wasser bei 25 °C in Abhängigkeit des Drucks nach den Angaben von Kell (1972) ist nichtlinear, kann aber für die folgenden Abschätzungen zur Drucksprüngeinrichtung durch eine Gerade approximiert werden.

### 2.6.2. Die mechanische Ausführung der Drucksprunganlage

Drucksprüngeinrichtungen sind aus der Literatur für optische Spektrometer in vielfältiger Ausführung bekannt. Die bevorzugte Methode zur Auslösung des Drucksprungs sind Stapel von Piezoaktoren, die über eine Membran den Probenraum komprimiert (Clegg & Maxfield 1976). Jacob et al. (1999) erreichte mit der Methode nach Clegg Drucksprünge von Normaldruck auf 16 MPa, dies ist ausreichend, um mit Zirkulardichroismus die Änderungen im beobachteten Kältschockproteins von *Bacillus subtilis* zu beobachten. Für NMR-Methoden genügt dies jedoch nicht. Wie aus den in den folgenden Kapiteln vorgestellten Ergebnissen der statischen Druckmessungen ersichtlich ist, zeigen sich Änderungen der chemischen Verschiebungen erst bei Druckänderungen ab 50 MPa. Druckdenaturierungen sind bei *TmCsp* selbst bei Druckvariationen von 200 MPa nicht zu beobachten. Bei anderen Proteinen wie z.B. *RalGDS* (Inoue et al. 2000) verschwinden ab etwa 100 MPa einzelne Signale durch Druckdenaturierung, bei *TmCsp* ist selbst bei 200 MPa keine Denaturierung zu erkennen. Das bedeutet, dass Drucksprünge für NMR-Messungen je nach Protein 100 MPa und mehr Hub benötigt wird. Dies ist mit Piezostempeln nicht zu erreichen. Der größte in den NMR-Spektrometern einsetzbare Piezoaktor (P-245.20 von Physik Instrumente) liefert eine Kraft von 3,4 kN bei einem Hub von 170  $\mu\text{m}$ . Mit Gl.2.2. und dem Volumen der Saphirzelle von  $V_0$

= 423 mm<sup>2</sup> kommt man auf ein zu komprimierendes Volumen von  $\Delta V = 15 \text{ mm}^3$ , bei einem Drucksprung von 100 MPa. Mit dem Hub von 170  $\mu\text{m}$  ergibt sich ein notwendiger Querschnitt des Kompressionsvolumens von 74 mm<sup>2</sup>. Die auf den Piezostempel wirkende Kraft beträgt etwa 7,3 kN, wozu dieser Piezoaktor nicht in der Lage ist. Eine Ausweg wäre mehrere Aktoren zu stapeln, um den Hub zu vergrößern. Dies würde eine Reduktion des Durchmessers bei konstantem Kompressionsvolumen erlauben. Grundsätzlich sind jedoch diese Piezoaktoren nur mit ferromagnetischen Gehäusen und mit Stahlfedern vorgespannt lieferbar und damit nicht zum Einbau im Spektrometer geeignet. Problematisch ist auch die Ausführung der Hochspannungszuleitung, die in dieser Bauart des Piezoaktors nicht im Spektrometer integriert werden könnte. Weiterhin wurde bei der obigen Rechnung nicht die Volumenausdehnung der Saphirzelle selbst und der elastischen Dichtungen berücksichtigt, sodass mit noch weit geringeren Amplituden des Drucksprungs gerechnet werden muss.

Um ausreichende Amplituden zu erhalten, muss die gesamte Einrichtung zur Erzeugung des Drucksprungs außerhalb des Spektrometers angeordnet werden. Im ersten Ansatz wurde eine elektrisch angetriebene Kolbenpumpe aufgebaut. Die Umsetzung der Drehbewegung in eine Hubbewegung des Kolbens erfolgte durch zwei spiralförmig gefräste, gegeneinander gerichtete Scheiben. Durch langsames gegenseitiges Verdrehen der Spiralscheiben bewegt sich der Druckkolben zur Kompression des Druckmittels in den Druckzylinder bis nach einer vollen Umdrehung die Abrisskante der Spiralplatten erreicht ist und eine schlagartige Dekompression durch Wegfall der mechanischen Unterstützung des Kolbens erfolgt. Da die technischen Möglichkeiten der Werkstätten der Universität Regensburg begrenzt sind, wurde zu weiches Material für die Spiralplatten verwendet, sodass ein längerer Betrieb unmöglich war. Zudem konnte für die Dichtungsprobleme an der Drehdurchführung der Antriebswelle keine zufriedenstellende Lösung gefunden werden. Als Alternative wurde eine pneumatische Steuerung aufgebaut, die schematisch in Abb.2.17. dargestellt ist.

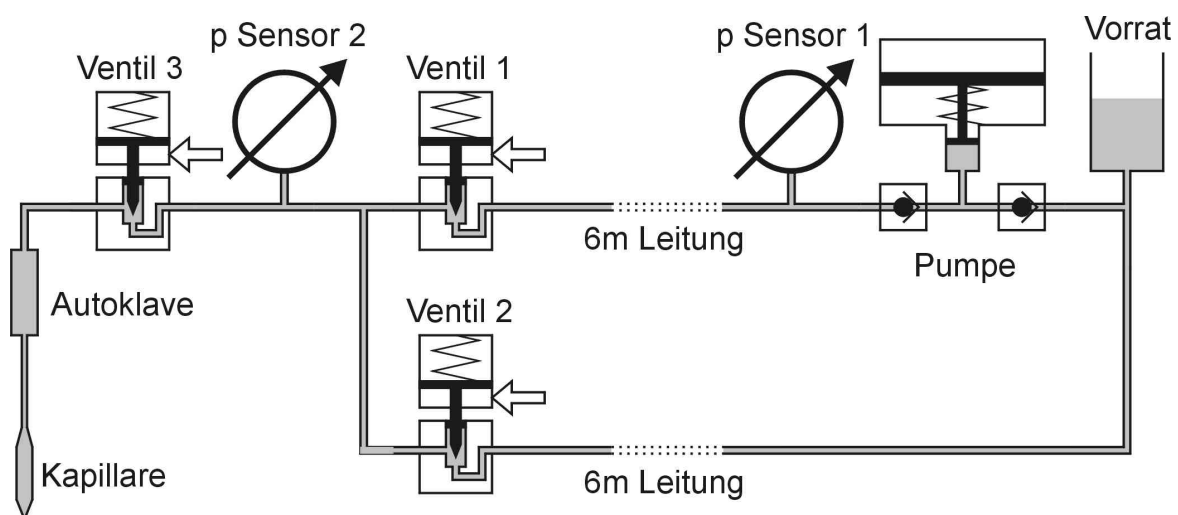


Abb.2.17. Die kontinuierlich arbeitende Druckluftpumpe (Dunze) erzeugt einen konstanten Vordruck, der über die pneumatischen Hochdruckventile (Novaswiss) in den Zuleitungen zur Kapillare auf den gewünschten Wert herunter geregelt wird. Das letzte Ventil vor der Kapillare erlaubt einen Drucksprung in beide Richtungen. Die Hochdruckventile werden mit Pressluft gesteuert, die von der elektronischen Steuerung durch elektrische 24 Volt Pneumatikventile kontrolliert wird. Die Druckmessung erfolgt durch zwei Sensoren mit Dehnungsmessstreifen (Burster).

Zum Betrieb der Anlage ist ein konstanter Vordruck von 200 MPa notwendig, der durch eine kontinuierlich laufende pneumatisch betriebene Druckpumpe (Dunze) erzeugt wird. Durch Öffnen des Ventils 1 baut sich am Drucksensor 2 ein hydrostatischer Druck auf. Die Zuleitung von etwa 6 m Länge wirkt dabei als Drossel, sodass bei Erreichen des gewünschten Druckniveaus, Ventil 1 geschlossen wird. Durch Öffnen des Ventils 3, gelangt der Druck an die Kapillare über eine Zuleitung von etwa 2 m. Diese Leitung führt zu einer Dämpfung des Druckstoßes, die exakt nur experimentell zu ermitteln ist. Eine Abschätzung zur Dämpfung wird weiter unten gegeben. Nachdem der Drucksprung ausgeführt wurde, wird Ventil 2 geöffnet und die Druckflüssigkeit strömt in den Vorratsbehälter der Druckpumpe zurück. Durch geeignete Ansteuerung, sind mit dieser Anlage Drucksprünge zwischen verschiedenen Druckniveaus in beide Richtungen möglich. Ein Einsatz als automatische Druckbank für Messungen unter statischem Druck ist ebenfalls möglich.

Die entscheidenden Bauteile der Druckanlage sind die Hochdruckventile der Firma Novaswiss, deren Eignung zur Erzeugung von Drucksprüngen in den Arbeiten von Woenckhaus et al. (2000, 2001) bewiesen wurde. Wie in den schematischen Darstellungen der Ventile 1 bis 3 in Abb.2.17. erkennbar, handelt es sich bei diesen Ventilen um konventionelle Nadelventile, die über einen einseitig wirkenden Pressluftzylinder mit Hilfe von Druckluft geöffnet werden. Nach dem Entlüften der Zylinder, werden die Nadelventile durch Federwirkung geschlossen. Die Schaltzeiten der Hochdruckventile sind abhängig von der Arbeitsrichtung. Nach Angaben von Woenckhaus liegen diese bei 4 ms für die Rückstellung in die Ausgangslage durch Federkraft und im Bereich von 100 ms für die Betätigung durch Druckluft. Diese Zeiten sind für die hier durchzuführenden Messungen nicht akzeptabel, zumal durch die häufige Wiederholung mit einer Drift der Schaltzeiten zu rechnen ist. Um diese mechanisch bedingten Ungenauigkeiten auszuschließen, muss jede Einzelmessung des Spektrometers von der Druckanlage ausgelöst werden. Die Drift der Schaltzeiten aller Komponenten muss durch eine Microcontrollerschaltung nach den Daten des Drucksensors (Burster) ( $p$  Sensor 2 in Abb.2.17) kompensiert werden. Durch die Auslösung der Messung von der Druckanlage aus, spielen die Schaltzeiten der Ventile keine Rolle, da das Spektrometer durch die elektronische Steuerung mit der Druckanlage synchronisiert wird.

Der Druckanstieg an der Kapillare wird im wesentlichen vom Innendurchmesser des Verbindungsrohrs von den Ventilen zur Kapillare bestimmt. Um steile Flanken zu erhalten, ist ein Druckleitung mit 1 mm Innendurchmesser ausreichend, da nur geringe Flüssigkeitsmengen transportiert werden müssen. Die Durchflussmenge  $Q$  kann aus der mittleren Fließgeschwindigkeit einer laminaren Strömung durch ein Rohr mit Innenradius  $R$  aus dem Gesetz von Hagen-Poiseuille abgeleitet werden (Gl.2.3.) Kneubühl (1988). Als vereinfachendes Modell wird angenommen, dass der Druck  $p_2$  am Drucksensor 2 (Abb.2.17) konstant bleibt, während der Druckausgleich mit der Hochdruckkapillare stattfindet. Weiterhin wird das Volumen der Druckleitung zwischen Kapillare und Ventil 3 vernachlässigt. Durch Einsetzen von Gl.2.4. in Gl.2.3. und Integration über Druck  $p$  und Zeit  $t$ , erhält man den zeitlichen Verlauf des Drucks an der Kapillare (Gl.2.5.).  $\alpha$  ist die Kompressibilität von Wasser bei 25 °C aus Gl.2.2.  $\eta$  ist die Viskosität der Druckflüssigkeit (Methylcyclohexan). In Tab.2.4. sind die Viskositäten von Wasser und Methylcyclohexan und Wasser bei verschiedenen Temperaturen und Normaldruck zu finden. (Grigoriev & Meilikhov 1997).

Die Abschätzung zeigt, dass bei Verwendung eines Rohres mit Innenradius  $R = 0,5$  mm die Anstiegszeit unterhalb von 5 ms liegt. Der Parameter  $R$  geht mit der 4. Potenz in die Formel Gl.2.5. ein, alle anderen Parameter beeinflussen die Anstiegszeiten linear. Eine beliebige Vergrößerung des Innenradius ist wegen der Druckbeständigkeit des Rohrs nicht möglich. Zur

präzisen Ermittlung des Druckverlaufes wäre eine optische Messeinrichtung direkt an der Saphirzelle notwendig, die derzeit nicht existiert.

	<b>H<sub>2</sub>O</b> $\eta[\text{kg m}^{-1}\text{s}^{-1}]$	<b>Methylcyclohexan</b> $\eta[\text{kg m}^{-1}\text{s}^{-1}]$
<b>280 K</b>	1,42	1,06 (290K)
<b>300 K</b>	0,82	0,90
<b>320 K</b>	0,56	0,67
<b>340 K</b>	0,41	0,53
<b>360 K</b>	0,32	0,43

Tab.2.4. Die Viskositäten von Wasser und Methylcyclohexan nach den Daten von (Grigoriev & Meilikhov 1997).

$$Q = -\frac{\pi}{8\eta} \frac{(p_2 - p)}{l} R^4 = \frac{dV}{dt} \quad (\text{Gl.2.3.})$$

$$dV = \alpha V_0 dp \quad (\text{Gl.2.4.})$$

$$p = p_2 \left( 1 - \exp\left(\frac{-t\pi R^4}{8\alpha\eta l}\right) \right) \quad (\text{Gl.2.5.})$$

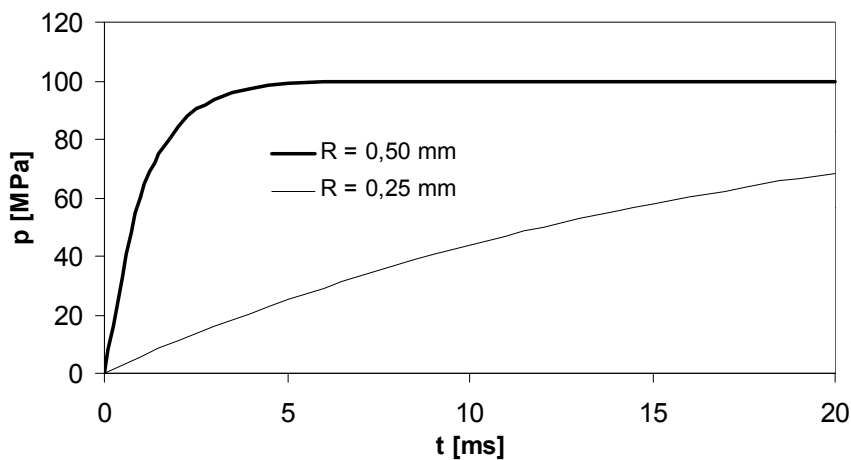


Abb.2.18. Druckanstieg an der Hochdruckkapillare als Antwort auf einen Drucksprung von 0,1 auf 100 MPa durch Öffnen von Ventil 3 in Abb.2.17. bei einer Temperatur von  $T = 300$  K. Entscheidender Parameter für die Anstiegszeit des Drucks ist der Innenradius  $R$  des Verbindungsrohrs von Ventil 3 zur Hochdruckkapillare. Der Radius geht mit der 4. Potenz in die Rechnung ein.

Ein Nachteil der Anlage soll hier nicht verschwiegen werden. Die verwendete Druckflüssigkeit ist feuergefährlich, wobei unter ungünstigen Umständen der gesamte Vorrat in das Spektrometer gepumpt werden kann. Die Flüssigkeit kann sich dort, entweder durch Funkenüberschlag der Sendespulen, oder am heißen Heizelement, entzünden. Aus Sicherheitsgründen wurden Ventile verwendet, die bei Ausfall der Pressluft in die geschlossene Lage zurückfallen. Eine geeignete nicht brennbare Hydraulikflüssigkeit konnte bisher nicht gefunden werden. Die Viskosität von Hydraulikölen steigt mit fallender

Temperatur zu sehr an, Wasser führt zur Korrosion in der Anlage, auch Freone wie Dibromtetrafluormethan ( $\text{CBr}_2\text{F}-\text{CF}_3$ ) führen zur Korrosion (persönliche Mitteilung H.-D.Lüdemann). Zur Risikominimierung kann einerseits immer mit Stickstoff gekühlt werden, da sich durch den fehlenden Luftsauerstoff kein zündfähiges Gemisch bilden kann, zum anderen ist die im folgenden beschriebene Microcontrollersteuerung im Vergleich zu einem PC gegen elektromagnetische Störeinflüsse wesentlich stabiler.

### 2.6.3. Elektronische Steuerung

Die Druckanlage wird von einem Microcontroller (80c517a Infineon) gesteuert. Microcontroller sind eigenständige Rechner, deren Recheneinheit mit zahlreichen Peripherieeinheiten auf der selben Chipfläche integriert ist. Diese Peripherieeinheiten sind im Fall des 80C517a Rechners ein 100 kHz, 10 Bit Analog-Digital-Wandler, mehrere Zähler und Frequenzgeneratoren mit Zählraten bis zu 1 MHz, Ein-/Ausgangsleitungen (Ports) zur Verbindung mit RAM, ROM und anderen externen Komponenten, sowie Schnittstellen zur seriellen Kommunikation mit anderen Rechnern. Zur Steuerung der Druckanlage wird der 80C517a auf einer konventionellen Microcontroller Entwicklungsplatine (Phytec) verwendet, die mit einem Flash-Eprom zur Speicherung des Steuerprogramms und RAM ausgestattet ist. Das Steuerprogramm wird auf einem PC erstellt und über eine serielle Schnittstelle (RS232) auf das Microcontrollerboard geladen, dort bleibt das Programm auch nach Ausschalten der Stromversorgung im Flash-Eprom erhalten. Der Vorteil einer Lösung mit Microcontrollern, gegenüber der Steuerung mit einem PC, liegt in der hohen Verarbeitungsgeschwindigkeit von eingehenden Signalen und der unmittelbaren Reaktion durch Interrupts im Bereich von  $\mu\text{s}$  auf externe Ereignisse. Durch Einschränkungen der Betriebssysteme von PC's sind derart schnelle Reaktionen dort nicht zu realisieren.

Abb.2.19. zeigt ein Blockschaltbild der Steuerung, Abb.2.20. zeigt die zum Anschluss an das Microcontrollerboard vorgesehene Ein-/Ausgabeplatine. Der Microcontroller steuert über seine Portleitungen und nachgeschaltete Leistungstreiber (BTS 409) Druckluftmagnetventile, die zur pneumatischen Steuerung der Hochdruckventile dienen. Die Drucksensoren werden über Vorverstärker (LM324) zur Strom-Spannungswandlung an den ADC des Microcontrollers weitergeleitet. Zur Vermeidung von Ungenauigkeiten der Druckmessung durch Kontaktkorrosion wurden Drucksensoren (Burster) mit Stromschnittstelle verwendet. Eine Kalibrierung der Drucksensoren ist durch Schließen der Reed-Relais (HE 751) automatisch möglich. Für zukünftige Anwendungen ist noch eine 5 Ampere Vierquadrantenbrücke zur Ansteuerung von Gleichstrommotoren oder zum Aufbau eines Hochspannungskonverters für Piezoaktoren vorgesehen.

Zur Protokollierung und Visualisierung der Daten werden diese über die RS232 Schnittstelle an einen PC übergeben. Die Kommunikation zum Bruker Spektrometer wird über zwei Leitungen des TCU-Port1 im Spektrometer Schaltschrank durchgeführt. Mit der Sendeleitung wird ein Taktsignal an den Microcontroller ausgegeben. Der Microcontroller berechnet aus der Länge des Pulses in  $\mu\text{s}$  die gewünschte Höhe des einzustellenden Drucks. Nach Erreichen des Solldrucks gibt der Microcontroller über die zweite Leitung eine Freigabe an das Spektrometer zur Ausführung der Messung.

Je nach Betrieb der Anlage als automatische Druckbank, oder als Drucksprungeinrichtung, müssen diverse Parameter vom PC aus eingestellt werden, die eigentliche Messung läuft unabhängig vom PC, der nur die einlaufenden Daten protokolliert.

Die Druckbanksteuerung erfolgt durch Steuerbefehle in der Syntax von Bruker, die in die Pulsprogramme einzubinden sind. Die Sendeleitung vom Spektrometer zum Schaltschrank am TCU-1 ist an der IO-Leitung Port 5 Pin 14 zu finden mit den Befehlen „10u setnmr5|14“ wird der TTL Pegel der Leitung von 0 auf 5 Volt gesetzt mit „10u setnmr5^14“ wieder zurück.

Zwischen beiden Flanken muss eine Zeit „d2“ abgewartet werden, deren Länge in  $\mu\text{s}$  der gewünschten Druckstufe in MPa entspricht.

Sobald der Solldruck von der Druckanlage ausgeregelt wurde, gibt diese an das Spektrometer eine Freigabe zur Messung über die zweite Steuerleitung. Um auf die Freigabe durch die Druckanlage zu warten, ist der Befehl „if (trigpl1) goto lab2“ im Pulsprogramm einzubinden. Sobald ein Wechsel des Pegels von 0 auf 5 Volt am Eingang des Spektrometers registriert wird, setzt das Pulsprogramm seinen Lauf fort. Zusammenfassend werden hier die notwendigen Zeilen zum Auslösen und Abwarten des Drucksprungs im Pulsprogramm des Spektrometers dargestellt:

Pulsprogrammbefehl zur Einstellung eines Drucks (Druck [MPa] = Länge d2 [ $\mu\text{s}$ ]):

```
....
10u setnmr5|14
d2
10u setnmr5^14
```

Pulsprogrammbefehl zum Abwarten auf Freigabe von der Druckbank :

```
....
lab1, if (trigpl1) goto lab2
goto lab1
....
lab2, d1
p1
go = lab1
....
```

Die Ausführungen zur Druckbanksteuerung enden hier, da eine vollständige Beschreibung der gesamten Steuersoftware in PC und Microcontroller jeglichen Rahmen sprengen würde. Endgültige Aussagen über die Funktion der Anlage können erst nach der Fertigstellung der Software getroffen werden. Insbesondere ist noch nicht geklärt, inwieweit die Saphirzellen der Stoßbelastung standhalten und wie die Ventile im Dauerbetrieb reagieren.

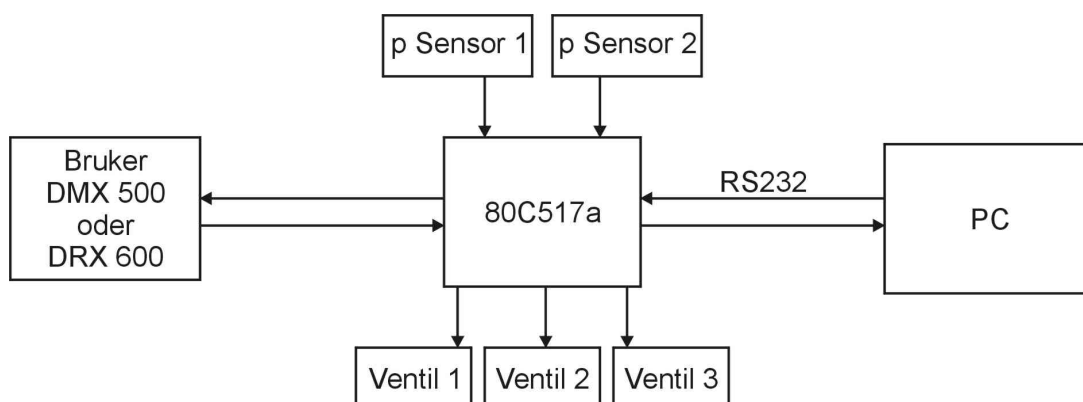


Abb.2.19. Die Anbindung der Druckbanksteuerung an die Bruker Spektrometer erfolgt über zwei Steuerleitungen. Der PC dient zur Eingabe von Messparametern und protokolliert die Soll- und Istwerte der Druckbanksteuerung.



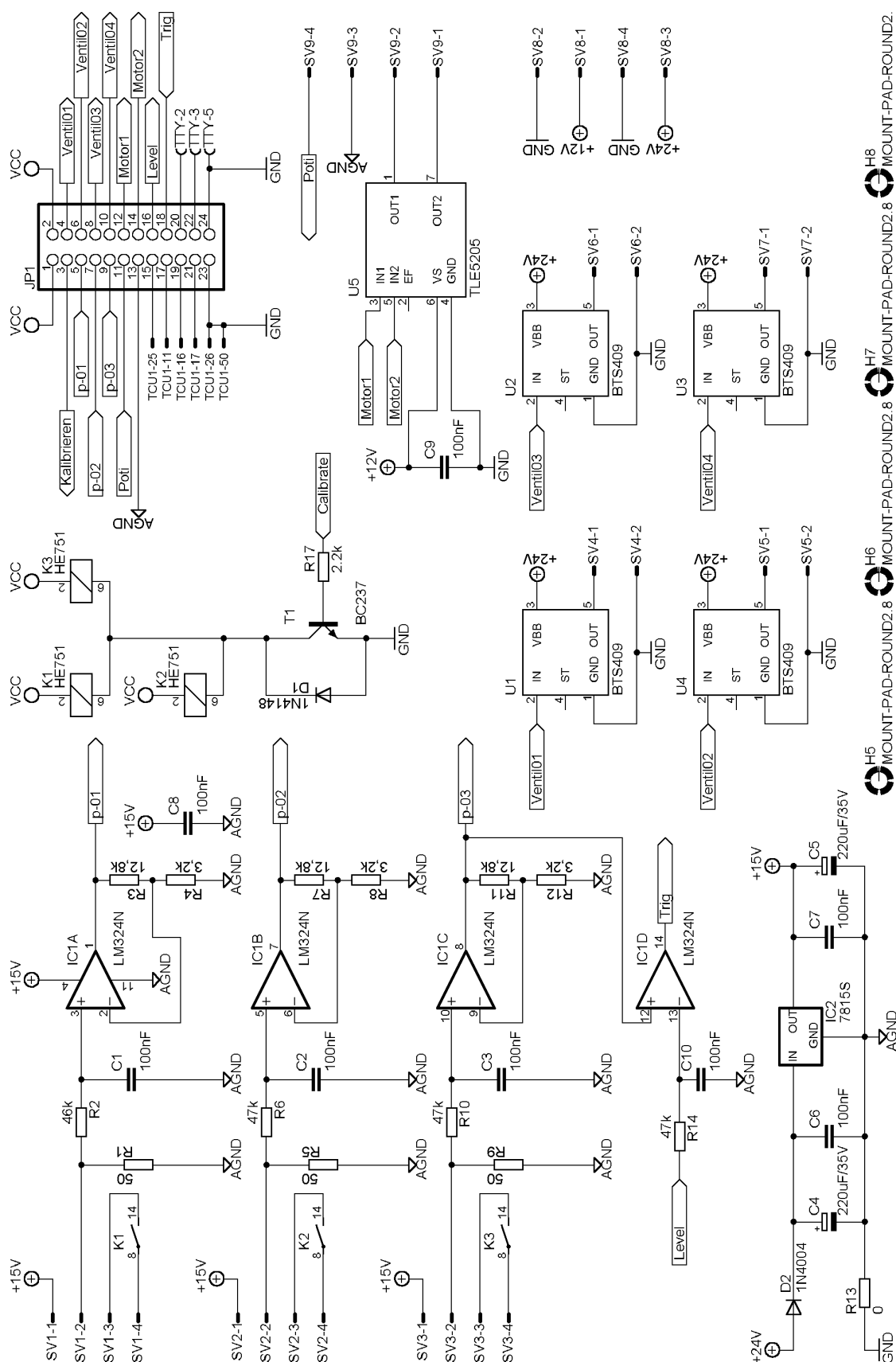


Abb.2.20. Schaltplan der Ein- Ausgabeplatine der Druckbanksteuerung mit Strom-Spannungswandlern (LM324), Leistungstreibern (BTS409), Vierquadrantenbrücke (TLE 5209), Spannungsversorgung der Drucksensoren (7815S) und Reed-Relais (HE 751).

### 3. $T_1$ -Relaxation und Intradiffusion von Wasser

Die Kenntnis der speziellen Eigenschaften des Wassers ist von hoher Bedeutung zur Beurteilung der komplexen Vorgänge bei der Proteinfaltung. Insbesondere bei NMR-Messungen unter Hochdruck können Veränderungen in den Spektren erst bei Berücksichtigung der vom Lösungsmittel herrührenden Effekte verstanden werden, zumal diese Anomalien des Wassers genau im relevanten Temperaturbereich für Proteine am stärksten ausgeprägt sind. Aus diesen Überlegungen heraus wurden die bis 250 MPa schon bekannten Werte des Selbstdiffusionskoeffizienten  $D$  und der  $T_1$ -Spin-Gitter-Relaxationszeit der Kerne  $^{17}\text{O}$  und  $^2\text{H}$  in schwerem Wasser um Messungen im Bereich von 298 bis 240 K und Drücken von 200 MPa bis 400 MPa ergänzt.

Mit diesen Ergebnissen konnte zum ersten Mal die Existenz eines Maximums der  $T_1$ -Isothermen belegt werden. Die Lage des Maximums von  $^{17}\text{O}$ - $T_1$  bei ca. 250 MPa ist sowohl für leichtes, als auch für schweres Wasser unabhängig von der Temperatur, die schon bekannten Maxima der Diffusion liegen in beiden Systemen um 150 MPa.

Die Höhe der Maxima nimmt streng mit fallender Temperatur zu. Der Mobilitätsgewinn mit steigendem Druck ist für die rotatorische Beweglichkeit, repräsentiert durch  $T_1$ , stärker, als für die translatorische Beweglichkeit, repräsentiert durch die Diffusion. Diese Anomalie wird später qualitativ diskutiert.

#### 3.1. Einführung

Die ungewöhnlichen Eigenschaften des Wassers treten umso stärker hervor, je tiefer die Temperaturen fallen, dies gilt besonders im metastabilen unterkühlten Bereich des Phasendiagramms Abb.3.1. zwischen der Schmelzdruckkurve ( $T_M$ ) und der homogenen Nukleationsdruckkurve ( $T_H$ ).

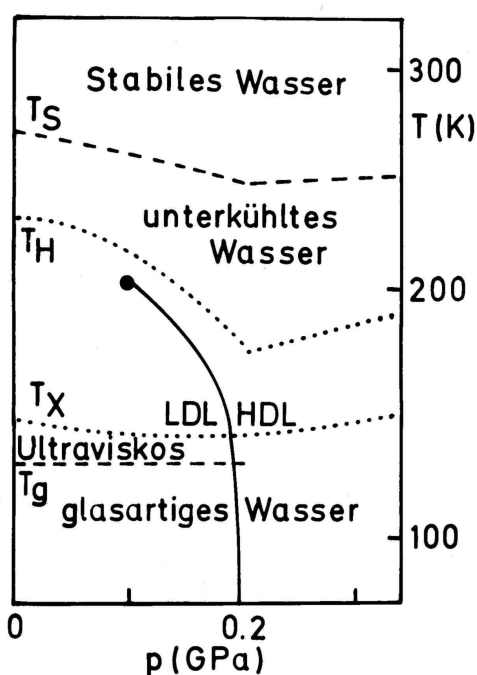


Abb.3.1. Das Phasendiagramm von Wasser (modifiziert nach Stanley 2000) zeigt den Bereich des unterkühlten Wassers, der hier um Daten zu Diffusion und  $T_1$  bei Drücken bis 0,4 GPa ergänzt wurde.

Für Wasser/Öl-Emulsionen konnte Kanno et al. (1993)  $T_H$  bis zu 300 MPa im unterkühlten metastabilen Bereich bestimmen. In diesem Druckbereich erreicht  $T_H(\text{H}_2\text{O})$  ein Minimum von 181 K bei 200 MPa und steigt bei weiterer Druckerhöhung leicht an.

Die bis dato umfangreichsten theoretischen Ansätze zur quantitativen Beschreibung der thermodynamischen, dynamischen und spektroskopischen Eigenschaften lieferten Angell et al. (2000), sowie Stanley et al. (2000), ein allgemein akzeptiertes Modell konnte sich bisher jedoch nicht durchsetzen. Ein Versuch der Beschreibung der Anomalien der physikalischen Eigenschaften im instabilen Bereich zwischen  $T_H$  und der Glasübergangstemperatur  $T_g$  postuliert die Existenz zweier nicht mischbarer Flüssigkeiten, diese sind Wasser hoher (HDL high density liquid) und niedriger Dichte (LDL low density liquid). Beide Modifikationen werden durch eine Phasengrenze erster Ordnung getrennt, die in einem zweiten kritischen Punkt endet (Mishima et al. 1998) (Abb.3.1.). Mit Hilfe umfangreicher Computer-Simulationen unter Berücksichtigung der metastabilen und instabilen Regionen des Phasendiagramms leiteten Errington und Debenedetti (2001)

eine Beziehung zwischen der Struktur des Wassers und seinen thermodynamischen, wie dynamischen Eigenschaften ab. Um weiteres Material für die Diskussion über die richtige Beschreibung unterkühlten Wassers vorzulegen, wurden die bekannten Daten des Selbstdiffusionskoeffizienten  $D$  in unterkühltem  $H_2O$  und  $D_2O$  von Prielmeier (1987, 1988), sowie die Daten der Spin-Gitter-Relaxationszeit ( $T_1$ ) von  $^1H$  (Lang 1977, 1981), von  $^2H$  (Lang 1980, 1984) und von  $^{17}O$  (Lang 1981) in  $H_2O$  und  $D_2O$  um Messungen von 200 bis 400 MPa erweitert.

Dies wurde zum einen durch Fortschritte in der Herstellung hochfester Borosilikatglaskapillaren (Yamada et al. 1974, Price & Lüdemann 1997) und zum anderen durch die weit höhere Empfindlichkeit und Zeitauflösung des Bruker DMX 500 MHz Spektrometers erreicht.

Die früheren  $T_1$ -Messdaten wurden weitgehend in Wasser/Öl Emulsionen aufgenommen, die der Selbstdiffusionskoeffizienten dagegen in sorgfältig gereinigtem Wasser. Obwohl die Vorbereitung der Wasser Öl Emulsionen vom gleichen Experimentator (Prof. Dr. H.-D. Lüdemann) wie bei den alten Messungen durchgeführt wurde, war es, entgegen der Arbeit von Kanno (1993), nicht möglich, die Emulsionen über längere Zeiten bei Temperaturen unter 260 K und Drücken über 250 MPa zu stabilisieren, alle Messungen wurden daraufhin in reinem Wasser durchgeführt. Wegen einsetzender spontaner Kristallisation wurde der zu vermessende Bereich unterkühlten Wassers drastisch eingeschränkt.

## 3.2. Materialien und Methoden

### 3.2.1. Aufbereitung der Proben

Die Wasserproben  $D_2^{17}O$  und  $H_2^{17}O$  (25%  $^{17}O$ ) stammen von der GFK Isotopenstelle Karlsruhe,  $D_2O$  (99,97%) stammt von Fa. E. Merck Darmstadt. Für die Messungen wurden jeweils neue Ampullen angebrochen.

Zur Messung im NMR-Spektrometer wurden Borosilikatglaskapillaren mit 0,1 mm Innendurchmesser und 1 mm Außendurchmesser verwendet, die Kapitel 2 detailliert beschrieben wurden. Vor der Messung wurden die Kapillaren sorgfältig mit MilliQ-Wasser gespült und in der Vakuumanlage getrocknet. Um eine zusätzliche Reinigung des Probenmaterials zu erreichen, wurden die Proben in der Hochvakuumanlage sublimiert (Abb.3.2.). Dazu wurde das Ausgangsmaterial in einen Rundkolben der Hochvakuumanlage gefüllt und mit flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurde bis zu einem Druck von  $10^{-3}$  Pa evakuiert. Bei Erreichen des gewünschten Drucks, wurde die Verbindung zur Vakuumpumpe (Drehschieberpumpe mit Diffusionspumpe und Kühlfalle) geschlossen und das gefrorene Probenmaterial leicht erwärmt. Ein zweiter daneben befindlicher Kolben der Hochvakuumanlage wurde durch Stickstoff gekühlt, um das Sublimat aufzufangen. In diesem Auffangkolben stand bereits die gereinigte Hochdruckkapillare, mit dem offenen Ende des Teflonschlauchs nach unten gerichtet. Nachdem sich das Probenmaterial vollständig im Auffangkolben niedergeschlagen hatte und durch leichtes Erwärmen aufgetaut worden war, konnte durch Belüften der Vakuumanlage mit Argon die Probe durch das einströmende Gas in die Hochdruckkapillare gepresst werden.

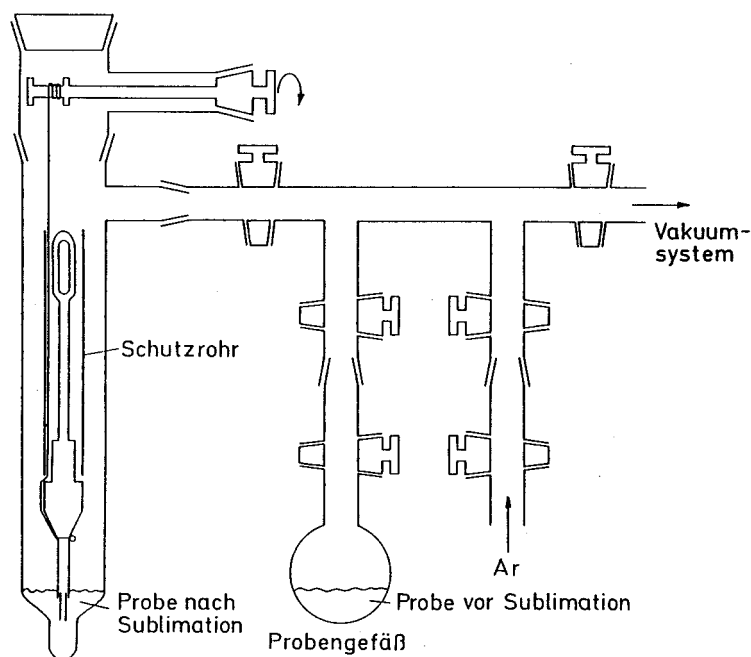


Abb.3.2. Die Hochvakuumanlage zur Aufreinigung des Probenmaterials durch Sublimation. Die Probe wird aus dem Rundkolben bei einem Vakuum von  $10^{-3}$  Pa in das Auffanggefäß (links) sublimiert. Nach der Sublimation wird die Anlage mit Argon belüftet, wobei das einströmende Gas die Probenflüssigkeit in die Kapillare presst. (entnommen aus Bachl 1988).

### 3.2.2. Ausführung der NMR-Messungen

Alle Messungen erfolgten am Bruker DMX 500 MHz Spektrometer mit einem 10 mm Breitband Probenkopf, der für  $^2\text{H}$  auf 76,75 MHz und für  $^{17}\text{O}$  auf 67,78 MHz abgestimmt wurde. Da nur zum Teil mit deuterierten Proben gearbeitet wurde, konnte zur Kompensation der Drift des Hauptmagneten kein Lock verwendet werden. Ein Verlust an Präzision ist dadurch nicht gegeben, da keine chemischen Verschiebungen zu bestimmen waren und die Zeitdauer der einzelnen Messungen im Bereich weniger Minuten lag.

Die  $T_1$ -Daten wurden mit der Inversion Recovery Pulssequenz gemessen. Pro Druck- und Temperaturstufe wurde bei 16 verschiedenen Zeiten jeweils ein 1D-Spektrum mit 128 Messungen und 4 kByte Speichertiefe gemessen. Zur Messung der kurzen  $T_1$ -Werte wurde eine Abtastrate des ADC (Dwell Time DW) von  $5 \mu\text{s}$  verwendet.

Die Selbstdiffusionskoeffizienten wurden mit der Spinecho-Technik mit gepulsten Feldgradienten gemessen (Stejskal & Tanner 1965). Pro Druck und Temperaturstufe wurden 16 1D-Spektren (128 Messungen, Speichertiefe 4 kByte) mit linear steigenden Strömen in den Gradientenspulen gemessen. Die Diffusionskoeffizienten  $D$  ergeben sich mit Gl.3.1. (Groß 2000) aus der Abschwächung des NMR-Signalvolumens  $A(2\tau)$  in Abhängigkeit der Stärke  $g$  und der Länge  $\delta$ , sowie dem Abstand der Gradientenpulse  $\Delta$  (Abb.3.3.).  $A(0)$  ist das Signalvolumen des Spinechos ohne Gradientenpulse und  $\gamma$  das gyromagnetische Verhältnis des betrachteten Kerns. Da die Stärke der Gradientenpulse in Absolutwerten nicht bekannt ist, muss diese unter Verwendung bekannter Werte der Diffusion kalibriert werden. Die Diffusionskoeffizienten erhält man aus der Geradensteigung bei logarithmischer Auftragung der Signalvolumina in Abhängigkeit der verwendeten Gradientenstärke.

$$A(2\tau) = A(0) \exp\left(-D(\gamma g \delta)^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right) \quad (\text{Gl.3.1.})$$

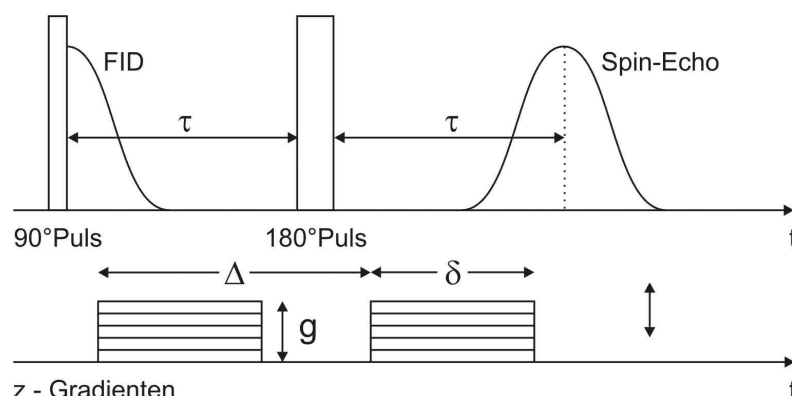


Abb.3.3. Pulsfolge des Hahn'schen Spinechos zur Diffusionsmessung. Nach der Zeit  $2\tau$  wird die Intensität des Spinechos in Abhängigkeit der Stärke der z-Gradienten vermessen. Aus der Gradientenstärke  $g$  und der Pulslänge  $\delta$ , sowie dem Abstand  $\Delta$  können die Diffusionskoeffizienten mit Hilfe von Gl.3.1. bestimmt werden.

Zur Einstellung des Drucks wurde eine manuell bediente Spindelpresse nach der Beschreibung in Kapitel 2 verwendet. Kontrolliert wurde der Druck mit Hilfe eines Bourdon-Manometers der Genauigkeitsklasse 0,1 ( $\pm 0,6$  MPa).

Die Einstellung der Messtemperatur erfolgte mit der Flüssigstickstoff-Temperiereinheit des Bruker DMX 500 MHz Spektrometers. Da die Maßnahmen zum Schutz des Probenkopfes vor Explosion der Kapillaren den Wärmeübergang zwischen Heizluftstrom und Probe behindern, wurde für die hier verwendeten Kapillaren eine Kalibrierung der Temperatur nach den Angaben von Raiford (1979) über den Abstand der chemischen Verschiebung  $\Delta\delta$  der Hydroxyl- und Methyllinien von Methanol vorgenommen. Im Bereich von 250 K bis 320 K ergibt sich die Proben temperatur aus Gl.3.2. Die Methanolprobe befand sich in einem identischen Aufbau wie die Wasserproben bei den Hochdruckmessungen.

$$T(K) = 403,0 - 29,53\Delta\delta - 23,87(\Delta\delta)^2 \quad (\text{Gl.3.2.})$$

Zur spektralen Auswertung und Bestimmung der Signalvolumina zur Messung von  $T_1$  und Selbstdiffusion wurde das Programm XWIN-NMR 2.6 von Bruker verwendet. Für die Datenauswertung kamen die Programme EXCEL (Microsoft) und ORIGIN 6.0 (Microcal) zur Anwendung. Der Fehler für die Spin-Gitter-Relaxationszeiten beträgt unter  $\pm 5$  %. Die Messungen der Selbstdiffusionskoeffizienten sind ebenfalls mit einem Fehler von  $\pm 5$  % behaftet.

### 3.3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.3.1. Die Selbstdiffusionskoeffizienten von $D_2O$ und $H_2O$

Abb.3.4. zeigt die neu gemessenen Daten von  $D(D_2O)$  in Kombination mit den publizierten Daten von Prielmeier (1987, 1988), Gillen (1972), Woolf (1976), Harris (1980). Die Daten verschiedener Provenienz stimmen alle innerhalb der Fehlergrenzen überein und zeigen

deutlich ein Maximum. Diese Zunahme der Mobilität wurde bisher nur für Isotopomere des Wassers beobachtet, manifestiert sich aber auch in Messungen der Viskosität (Harlow 1967, Osipov 1977), der dielektrischen Relaxation (Pottel 1989) und der aus Kernrelaxationsexperimenten abgeleiteten rotatorischen Korrelationszeit (Lang 1977, 1980, 1981a, 1981b, 1984, 1990).

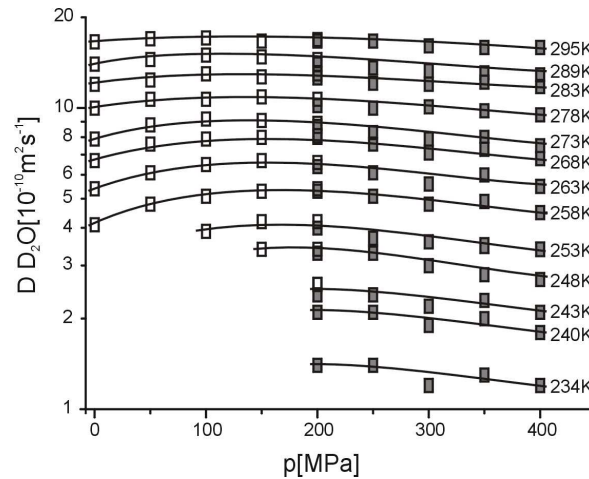


Abb.3.4. Die Isothermen der Selbstdiffusionskoeffizienten  $D$  von  $D_2O$ , die vollen Symbole zeigen die ergänzenden Messungen dieser Arbeit. Die Messwerte der offenen Symbole sind bei Prielmeier (1988), Gillen (1972), Woolf (1976) und Harris (1980) zu finden. Die Diffusion zeigt ein deutliches Maximum bei 150-200 MPa, dessen Ausprägung mit fallender Temperatur zunimmt. Der freie Bereich links unten ist wegen spontaner Kristallisation des Wassers der Beobachtung entzogen.

Das Maximum der Beweglichkeit von  $D(D_2O)$  liegt im Bereich von 150 - 200 MPa. Wie in Abb.3.4. gezeigt, werden die Kurven mit steigender Temperatur immer flacher, oberhalb von 300 K entspricht die Abnahme dem Verhalten normaler Flüssigkeiten ohne Wasserstoffbrückenbindungen. Bei Temperaturen unterhalb von 258 K konnte wegen Einsetzens der Kristallisation nur noch bei höheren Drücken gemessen werden.

Das zweite kritische Punkt Szenario, das von Stanley et al. (2000) vorgeschlagen wurde, erfordert, dass sich die Phasengrenze zwischen der instabilen Phase niedriger Dichte (LDL) und der Phase hoher Dichte (HDL) mit steigender Temperatur zu niedrigerem Druck verschiebt. Da nach diesem Modell die Anomalie des unterkühlten Wassers der LDL zugeschrieben wird, würde man eine Temperaturabhängigkeit des Druckes maximaler translatorischer Mobilität  $p_{max}$  erwarten. Dies ist jedoch, wie aus Abb.3.4. zu erkennen, für  $D_2O$  nicht der Fall. Auch  $p_{max}(H_2O)$  liegt zwischen 150 und 200 MPa ohne signifikante Temperaturabhängigkeit, wie von Prielmeier et al. (1987, 1988) gezeigt wurde.

Das Verhältnis  $D_r$  (Gl.3.3.) wird als dynamischer Isotopeneffekt der translatorischen Beweglichkeit zweier Isotopomere bezeichnet.

$$D_r = \left( \frac{D(H_2O)}{D(D_2O)} \right)_{T,p} \quad (Gl.3.3.)$$

Nach Prielmeier (1988) nimmt  $D_r$  für  $H_2O$  und  $D_2O$  mit fallender Temperatur zu. Im Gegensatz dazu, sind die druckabhängigen Änderungen von  $D_r$  bei konstanter Temperatur

nicht aussagekräftig gegenüber dem Messfehler von  $\pm 5 \%$ . In Tab.3.1. sind die Werte des dynamischen Isotopeneffekts des Translationsfreiheitsgrades der Wassermoleküle angegeben. Die Daten basieren teils auf eigenen Messungen, zum großen Teil aber auf den in Abb.3.4. verwendeten und bereits zitierten Literaturwerten. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit dem dynamischen Isotopeneffekt der  $T_1$ -Spin-Gitter-Relaxation erfolgt weiter unten.

$D_r$	273 K	263 K	252 K	243 K	233 K	$^b)D(av)_{r,p}$
50 MPa	1,32	1,32				1,32
100 MPa	1,27	1,32				1,29
200 MPa	1,34	1,30	1,37	1,48	1,63	1,43
300 MPa	1,38	1,39	1,50	1,58	1,68	1,51
400 MPa	1,36	1,33	1,43	1,47	1,47	1,41
$^a)D(av)_{r,T}$	1,33	1,33	1,44	1,51	1,60	

Tab.3.1. Dynamischer Isotopeneffekt  $D_r$  der Diffusion in leichtem und schwerem Wasser basierend auf eigenen Daten und Literaturwerten von Prielmeier (1987, 1988), Gillen (1972), Woolf (1980) und Harris (1980).  $D_r$  zeigt eine Zunahme mit abnehmender Temperatur, aber keine eindeutige Abhängigkeit vom Druck. Zur Verdeutlichung sind die Mittelwerte  $^a) D(av)_{r,T}$  der Isothermen, sowie  $^b) D(av)_{r,p}$  der Isobaren in der Tabelle zu finden.

### 3.3.2. $^2\text{H}$ und $^{17}\text{O}$ Spin-Gitter-Relaxationsmessungen

Die neuen Messergebnisse der  $T_1$ -Relaxationsmessungen von  $^2\text{H}$  und  $^{17}\text{O}$  sind im Anhang in den Tabellen 7.2.-7.4. zu finden, kombiniert mit den Daten aus der Literatur werden diese Daten in den folgenden Isothermen (Abb.3.5.-3.7.) dargestellt.

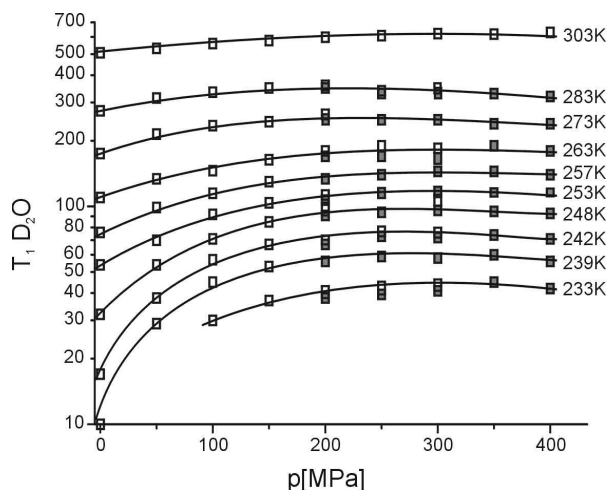


Abb.3.5. Isothermen der Deuterium Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$  in kaltem und unterkühltem  $\text{D}_2\text{O}$  (volle Symbole zeigen neue Daten, sonst entnommen aus Lang et al. (1990)). Die Ausprägung des Maximums nimmt mit fallender Temperatur zu, die Lage bei 250 MPa ist temperaturunabhängig. Wegen spontaner Kristallisation waren tiefere Temperaturen nicht erreichbar.

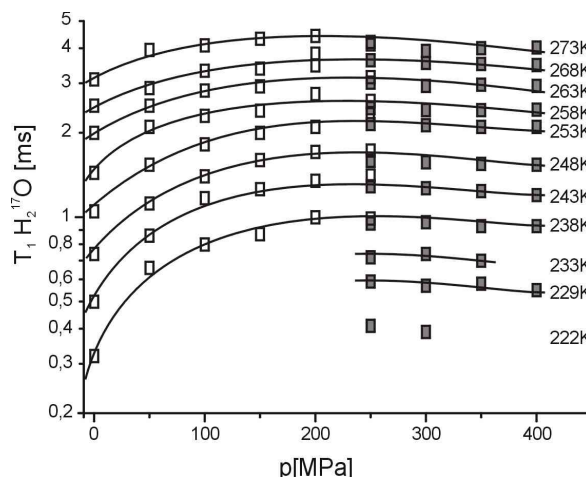


Abb.3.6. Isothermen der  $^{17}\text{O}$ -Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$  in kaltem und unterkühltem  $\text{H}_2\text{O}$  angereichert mit 50 %  $^{17}\text{O}$  (volle Symbole zeigen neue Daten, die übrigen sind entnommen aus Lang et al. (1981)). Das Maximum der Isothermen ist stärker betont als in Abb.3.5., die Ausprägung nimmt wieder mit fallender Temperatur zu. Die Lage bei 250 MPa ist wiederum unabhängig von der Temperatur. Aufgrund spontaner Kristallisation ist der freie Bereich links unten für Beobachtungen nicht zugänglich.

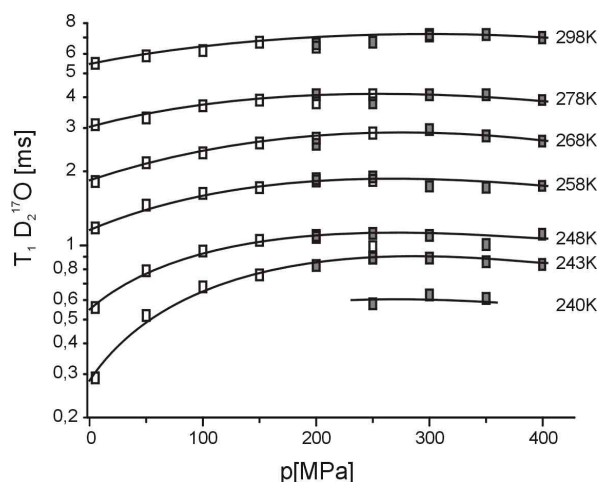


Abb.3.7. Isothermen der  $^{17}\text{O}$ -Spin-Gitter-Relaxation  $T_1$  in kaltem und unterkühltem  $\text{D}_2\text{O}$  angereichert mit 25 %  $^{17}\text{O}$  (volle Symbole zeigen neue Daten, sonst entnommen aus Lang et al. (1981)). Auch hier konnten wegen Einsetzens der Kristallisation keine tieferen Temperaturen vermessen werden. Die Ausprägung des Maximums nimmt wieder mit fallender Temperatur ab. Die Position bei 250 MPa ist invariant gegenüber Temperaturänderungen.

Sowohl Deuterium als auch  $^{17}\text{O}$  besitzen elektrische Quadrupolmomente. Lang et al. (1980-1990) zeigte, dass im hier besprochenen  $T, p$  Messbereich, die Quadrupolwechselwirkung die Spin-Gitter- und die Spin-Spin-Relaxation dominiert, wie dies auch theoretische Arbeiten belegen (Abragam 1982, Spiess 1978, Slichter 1990). Weiterhin führt die Betrachtung der älteren Deuterium und  $^{17}\text{O}$  Daten sowie Daten der Protonen  $T_1$ -Relaxation in Gemischen aus  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  und  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  mit 25 % - 50 %  $^{17}\text{O}$  Anteil (Lang 1981, 1990) zu dem Ergebnis, dass die Spin-Gitter-Relaxation in kaltem Wasser quantitativ als isotrope Bewegung mit Markov-Prozess und einer einzigen rotatorischen Korrelationszeit  $\tau_c$  beschrieben werden kann. Unter



diesen Bedingungen ist  $T_1$  durch Gl.3.4. gegeben, darin sei  $I$  der Kernspin ( $^2\text{H}$ :  $I=1$ ,  $^{17}\text{O}$ :  $I=5/2$ ),  $e^2qQ/\hbar$  die Quadrupolkopplungskonstante (QCC) mit dem Quadrupolmoment  $Q$ ,  $\eta_Q$  der Asymmetriefaktor des elektrischen Feldes am Kernort und  $\omega=2\pi\nu$  die Resonanzfrequenz des Kerns im Magnetfeld  $B_0$ .

$$\frac{1}{T_1} \equiv R_1 = \frac{3}{200} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left( \frac{e^2qQ}{\hbar} \right)^2 \left( 1 + \frac{\eta_Q^2}{3} \right) \cdot \left( \frac{\tau_2}{1+\omega^2\tau_2^2} + \frac{4\tau_2}{1+4\omega^2\tau_2^2} \right) \quad (\text{Gl.3.4.})$$

Die Gleichung Gl.3.4. gilt für Quadrupolkkerne mit  $I > 1$  ( $^{17}\text{O}$   $I=5/2$ ) nur im Bereich des "extreme narrowing limit"  $(\omega_0\tau_2)^2 < 1$ , was für den hier vermessenen Wertebereich nach den Ergebnissen von Lang (1990) zutrifft, außerhalb dieser Region sind Abweichungen vom exponentiellen Abfall der Magnetisierung (Spiess 1978) zu erwarten.

Der Beitrag von  $\eta_Q$  kann für  $^2\text{H}$  vernachlässigt werden, bei  $^{17}\text{O}$  liegen für  $\eta_Q$  die Werte nach Literaturangaben im Bereich  $0,72 < \eta_Q < 0,94$  (Verhoeven 1969, Brosnan 1980, Angell 1982). In Gasen und Festkörpern kann die QCC direkt bestimmt werden, in Flüssigkeiten existieren dagegen nur indirekte Methoden.

Für wasserstoffbrückenbildende Flüssigkeiten wurden in der Gasphase höhere QCC als in fester Phase gemessen, die Werte in flüssiger Phase sollten dazwischen liegen. Weniger polare Stoffe zeigen im Allgemeinen geringere Unterschiede in den verschiedenen Aggregatzuständen. Zur Übersicht zeigt Tab.3.2. die QCC der Kerne mit Quadrupolmoment in  $\text{D}_2\text{S}$ ,  $\text{ND}_3$  und  $\text{D}_2\text{O}$ .

Substanz	Kern	QCC (Gas)	Ref.	QCC (Festk.)	Ref
$\text{D}_2\text{S}$	$^2\text{H}$	149 kHz	O'Reilly 1970	155 kHz	O'Reilly 1970
$\text{ND}_3$	$^2\text{H}$	290,6 kHz	Kukulich 1968	156 kHz <sup>a)</sup>	Rabideau 1966
	$^{14}\text{N}$	4,09 MHz	Hougen 1972	3,43 MHz	Cummins 1987
$\text{D}_2\text{O}$	$^2\text{H}$	307,9 kHz	Bluyssen 1967	213,4 kHz	Edmonds 1975
	$^{17}\text{O}$	10,18 MHz	Verhoeven 1969	6,41 MHz	Brosnan 1980

Tab.3.2. Literaturwerte der Quadrupolkopplungskonstanten verschiedener Stoffe. Die Wechselwirkungen des Wasserstoffs mit den einsamen Elektronenpaaren von Stickstoff und Sauerstoff führen zu einer starken Abnahme der QCC beim Übergang vom Gas zum Kristall. <sup>a)</sup> Der Wert wurde bei 75 K gemessen, die Linienbreite könnte durch hohe Mobilität des Moleküls reduziert sein.

Quantenmechanische Berechnungen und experimentelle Ergebnisse über die Druck- und Temperaturabhängigkeit der QCC von  $^{17}\text{O}$  und  $^2\text{H}$  in flüssigem Wasser führten bisher nicht zu eindeutigen Resultaten (Ludwig 1995, Angell 1982). Ludwig et al. (1995) postuliert für die  $^2\text{H}$  QCC einen moderaten Anstieg mit der Temperatur, während die  $^{17}\text{O}$  QCC weniger sensitiv auf die Temperatur reagieren soll.

Vergleicht man den starken Rückgang der Werte aller QCC von  $\text{ND}_3$  und  $\text{D}_2\text{O}$  beim Übergang von der gasförmigen in die feste Phase (Tab.3.2.) mit dem kleinen Effekt bei  $\text{D}_2\text{S}$ , so scheint dieser Effekt durch die stärkere Wechselwirkung des Wasserstoffs mit den einzelnen Elektronenpaaren der Elemente Sauerstoff und Stickstoff in der ersten Reihe des Periodensystems bewirkt zu werden.

Diese Art der Wechselwirkung muss von der Temperatur abhängen, damit müssen auch alle QCC mit zunehmender Temperatur steigen und ebenso einen von der Dichte abhängigen Effekt zeigen. In Anbetracht der ähnlichen Quotienten  $^2\text{H}$  QCC (Eis) /  $^2\text{H}$  QCC (Gas) und  $^{17}\text{O}$  QCC (Eis) /  $^{17}\text{O}$  QCC (Gas) von  $\text{D}_2\text{O}$  aus Tab.3.2.würde man annehmen, dass auch die

Änderungen der beiden QCC mit Temperatur und Dichte gleich, oder zumindest sehr ähnlich wären. NMR-Messungen dynamischer Eigenschaften von Flüssigkeiten sind jedoch auf einen engen Druck und Temperaturbereich begrenzt, damit können zwangsläufig nur geringe Auswirkungen auf die QCC auftreten, die bisher nicht eindeutig beobachtet werden konnten.

Da weder die theoretischen Ansätze zur QCC, noch die zu ungenauen Messungen zu befriedigenden Ergebnissen führen würden, wird hier kein Versuch unternommen, die Rotationskorrelationszeiten  $\tau_2$  von den  $^2\text{H}$  und  $^{17}\text{O}$   $T_I$  zu berechnen. Die Diskussion muss sich daher auf qualitative Betrachtungen beschränken, als konkrete Aussage kann nur angenommen werden, dass innerhalb des eng umgrenzten  $T, p$  Messbereichs die Änderungen der QCC kleiner als der Messfehler sind.

Tab.10.2.-10.4. zeigt alle neu gemessenen  $T_I$ -Daten, die in Abb.3.5. - 3.7. mit den bisher bekannten Werten aus der Literatur zum Vergleich aufgetragen sind. Von den  $T_I$ -Messdaten und den älteren Literaturdaten wurden die Quotienten  $R_{int}(D_2O)$  berechnet, die durch Gl.3.5. definiert sind.

$$R_{int}(D_2O) = \left( \frac{T_I(^2H(D_2O))}{T_I(^{17}O(D_2^{17}O))} \right) \quad (\text{Gl.3.5.})$$

Die Resultate von  $R_{int}(D_2O)$  für einige Temperaturen und Drücke sind in Tab.3.3. zu finden. Variationen von  $R_{int}(D_2O)$  als Funktion von  $T$  und  $p$  um den Mittelwert von 79, sind zufällig und innerhalb der Fehlergrenzen, dabei ist zu berücksichtigen, dass Daten aus verschiedenen Quellen genutzt wurden. Innerhalb des hier experimentell untersuchten Bereiches scheint  $R_{int}(D_2O)$  konstant zu bleiben. Dies entspricht den Erwartungen, wenn folgende Bedingungen zutreffen:

- Die rotatorische Beweglichkeit der Wassermoleküle ist isotrop und wird durch Gl.3.5. beschrieben.
- Die QCC von Deuterium und Sauerstoff in schwerem Wasser zeigen die gleiche Druck- und Temperaturabhängigkeit.

$R_{int}(D_2O)$							
	303 K	283 K	263 K	253 K	242 K	239 K	<sup>b)</sup> $R_I(av)_p$
50 MPa	86	80	76	69	73	66	75
100 MPa	83	78	73	75	84	78	78
200 MPa	84	76	74	79	84		79
200 MPa	86	81	83	77	78	77	80
300 MPa	79	69	83	74	85	92	80
400 MPa	77	73	88	72	85	76	78
<sup>a)</sup> $R_I(av)_T$	82	76	80	74	82	78	

Tab.3.3. Quotient  $R_{int}(D_2O)$  der  $T_I$ -Werte von  $^2\text{H}$  - und  $^{17}\text{O}$  von  $D_2O$  nach der Definition in Gl.3.5. Die  $R_{int}$  zeigen keine Abhängigkeit von Druck und Temperatur wie die Mittelwerte <sup>a)</sup>  $R_I(av)_T$  der Isobaren, und <sup>b)</sup>  $R_I(av)_p$  der Isothermen zeigen. Dies gilt, wenn die rotatorische Beweglichkeit von Wasser isotrop ist und die QCC von Deuterium und Sauerstoff gleiche Druck- und Temperaturabhängigkeit zeigen.

Die QCC von  $^{17}\text{O}$  in  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  und  $\text{D}_2^{17}\text{O}$  sind innerhalb der Messgenauigkeit in fester und gasförmiger Phase gleich (Spiess 1978, Edmonds 1975, Brosnan 1980), daher sollte der dynamische Isotopeneffekt  $T_{lr}(^{17}\text{O})$  (Gl.3.6.) nach den klassischen Vorstellungen der

Flüssigkeitsdynamik für die rotatorische Beweglichkeit in leichtem und schwerem Wasser konstant bleiben.

$$T_{lr}(^{17}\text{O}) = \left( \frac{T_1(^{17}\text{O}(\text{H}_2^{17}\text{O}))}{T_1(^{17}\text{O}(\text{D}_2^{17}\text{O}))} \right)_{T,p} \quad (\text{Gl.3.6.})$$

Von den in Abb.3.6. und Abb.3.7. dargestellten Daten aus der Literatur und eigenen Messdaten wurden die in Tab.3.4. gelisteten Daten des dynamischen Isotopeneffektes abgeleitet. Die Daten von  $T_{lr}(^{17}\text{O})$  scheinen unabhängig vom Druck zu sein, steigen aber signifikant mit fallender Temperatur.

$T_{lr}(^{17}\text{O})$						
	273 K	263 K	253 K	243 K	238 K	$^c)R(av)_p$
<b>50 MPa</b>	1,43	1,42	1,51	1,65	1,74	1,55
<b>100 MPa</b>	1,35	1,41	1,48	1,72	1,57	1,51
<b>200 MPa</b>	1,30	1,52	1,47	1,63	1,63	1,51
<b>200 MPa</b>	1,24	1,36	1,52	1,49	1,47	1,42
<b>300 MPa</b>	1,16	1,32	1,54	1,43	1,62	1,41
<b>400 MPa</b>	1,33	1,43	1,57	1,43	1,39	1,43
$^a)R(av)_T$	1,30	1,41	1,52	1,56	1,57	
$^b)R(hp)_T$			1,54	1,45	1,49	

Tab.3.4. Der dynamische Isotopeneffekt des rotatorischen Freiheitsgrades des Paares  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$   $T_{lr}(^{17}\text{O})$  gemäß der Definition in Gl.3.6. ist von der Temperatur abhängig, wie die Mittelwerte  $^a) R(av)_T$  den Isothermen über alle Drücke und  $^b) R(hp)_T$  den Isothermen der neuen Daten von 200-400 MPa zeigen. Eine Druckabhängigkeit ist durch die Mittelwerte  $^c) R(av)_p$  der Isobaren aller Temperaturen nicht zu belegen.

Vergleicht man die Werte von  $D_r$  (Tab.3.1.) mit  $T_{lr}(^{17}\text{O})$  aus Tab.3.4., so legt die gleiche  $T, p$ -Abhängigkeit eine Kopplung von rotatorischer und translatorischer Beweglichkeit in Wasser für diesen Teil des Phasendiagramms nahe.

Sowohl für leichtes wie auch für schweres Wasser sind isobare Temperaturabhängigkeit, Selbstdiffusion und  $^{17}\text{O}$   $T_I$ -Zeiten in den Fehlergrenzen nahezu gleich. In Anbetracht der oben diskutierten Unsicherheit über die  $T, p$ -Abhängigkeiten der QCC beider Kerne in Wasser erscheint es unmöglich fundierte Rückschlüsse über die Entkopplung beider Moden der Beweglichkeit aus diesen Daten zu ziehen. Abb.3.8. zeigt die reduzierten Isobaren  $Q_X$  von  $\text{D}_2\text{O}$ , die wie folgt definiert sind :

$$Q_x = \left( \frac{X(T)}{X(T_{ref})} \right) \quad X = D, T_I(^{17}\text{O}) \quad T_{ref}(\text{H}_2\text{O}) = 273 \text{ K}, T_{ref}(\text{D}_2\text{O}) = 298 \text{ K} \quad (\text{Gl.3.7.})$$

Im Gegensatz dazu zeigt die isotherme Druckabhängigkeit des Selbstdiffusionskoeffizienten und der sich aus  $^{17}\text{O}$   $T_I$  ergebenden rotatorischen Beweglichkeit interessantere Effekte für  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{D}_2\text{O}$ , die in Abb.3.9. dargestellten Werte sind gegeben durch Gl.3.8.

$$R_x = \left( \frac{X(p)}{X(p_{ref})} \right) \quad X = D, T_I(^{17}\text{O}) \quad p_{ref}(\text{H}_2\text{O}) = p_{ref}(\text{D}_2\text{O}) = 0,1 \text{ MPa} \quad (\text{Gl.3.8.})$$

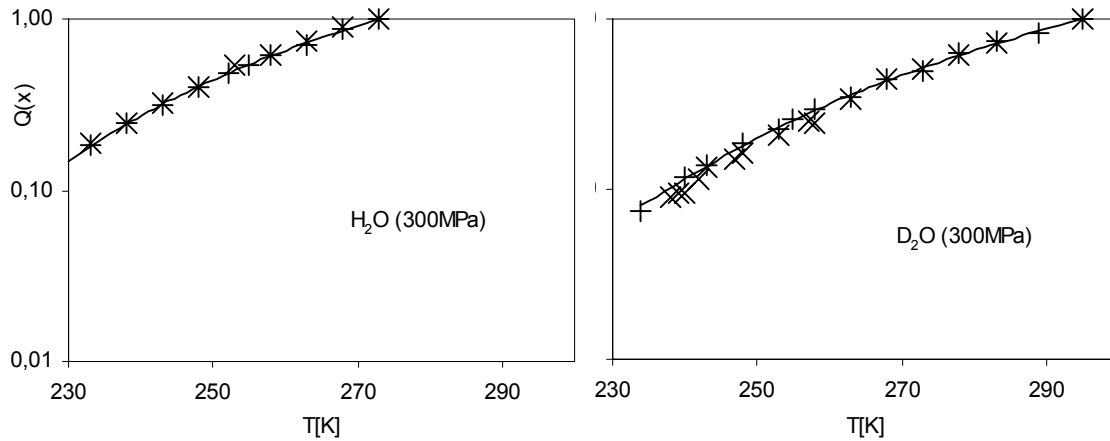


Abb.3.8. Die reduzierten Isobaren  $Q_X$  (Gl.3.7.) von  $T_I(^{17}O)$  (x) und die Selbstdiffusionskoeffizienten  $D$  (+) für  $H_2O$  und  $D_2O$  zeigen bei 300 MPa keine Unterschiede, rotatorische und translatorische Bewegung sind damit bei Variation der Temperatur nicht entkoppelt.

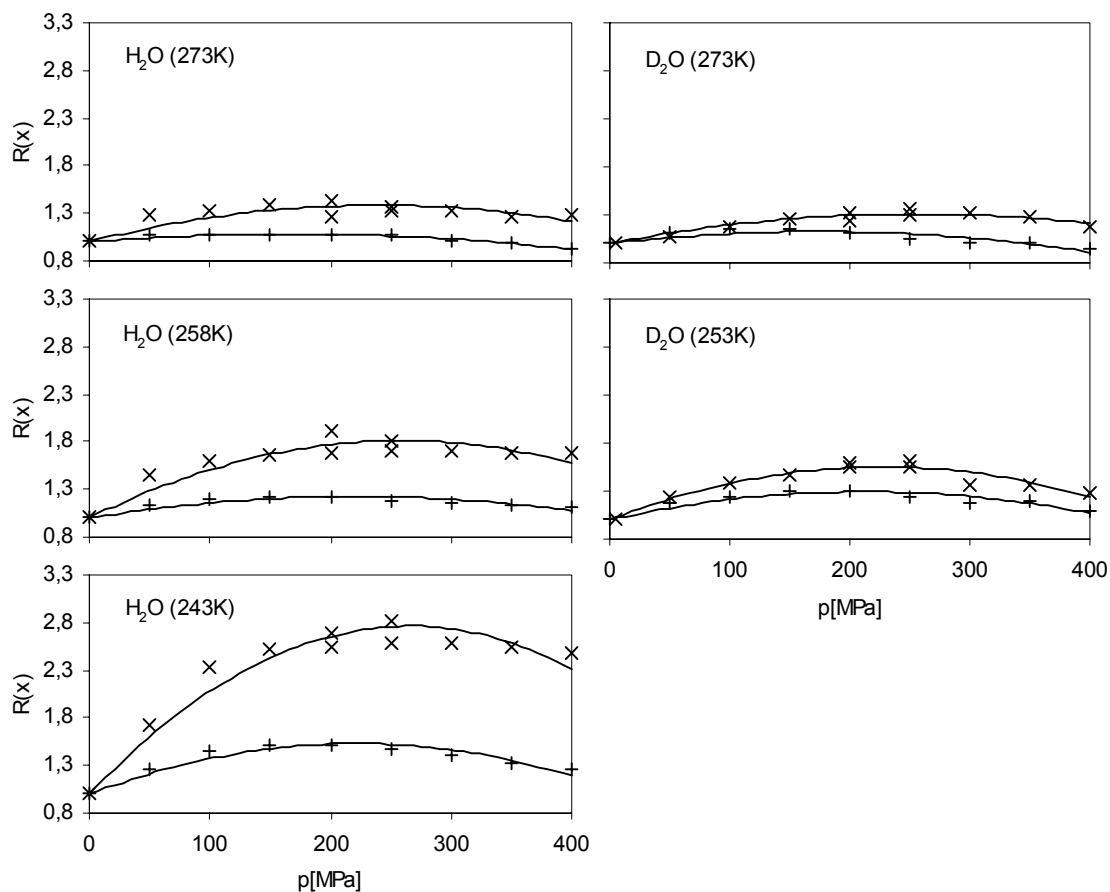


Abb.3.9. Die reduzierten Isothermen  $R_X$  (Gl.3.8.) von  $T_I(^{17}O)$  (x) und den Selbstdiffusionskoeffizienten  $D$  (+) von  $H_2O$  und  $D_2O$  zeigen deutliche Unterschiede, deren Ausprägung mit fallender Temperatur stärker wird, dies zeigt die Entkopplung der rotatorischen und translatorischen Bewegung bei Variation des Drucks.

In den Graphen (Abb.3.9) zeigen alle Isothermen von  $T_I(^{17}O)$  eine wesentlich stärker betonte Druckanomalie. Ein Vergleich der Isothermen zeigt, dass das Maximum der Isothermen von  $H_2O$  unabhängig von der Temperatur um 250 MPa liegt, aber mit fallender Temperatur ausgeprägter wird. Bei 243 K  $T_I(^{17}O)$  beträgt die relative Höhe des Maximums von  $H_2O$   $R_H$  (250 MPa)  $\approx 2,8$ . Das Maximum von  $D_2O$  liegt bei 150 MPa, ist aber mit  $R_D$  (150 MPa)  $\approx 1,5$  weniger betont.

Leider ist der Vergleich von translatorischer und rotatorischer Beweglichkeit nur bis 258 K möglich, da aus nicht bekannten Gründen  $D_2O$  nicht stärker unterkühlt werden konnte. Die intensiven Bemühungen zur Aufreinigung, die bei  $H_2O$  zum Erfolg führten, erwiesen sich bei  $D_2O$  weit weniger effektiv. Dies wurde auch bei früheren Versuchsreihen schon beobachtet (Prielmeier 1988, 1987).

Die Daten aus Abb.3.9. sind die einzigen, die weit außerhalb der Fehlergrenzen belegen, dass die Freiheitsgrade der Rotation und Translation von Wassermolekülen nicht streng gekoppelt sind.

Zusammenfassend können folgende Anomalien flüssigen Wassers festgehalten werden:

- Oberhalb von 300 K reduziert die mit Druck zunehmende Dichte die translatorische Mobilität wesentlich stärker als die rotatorische. Wasser ähnelt damit dem Verhalten normaler Fluide in denen Wasserstoffbrücken Assoziat ausbilden können.
- Unterhalb von 300 K steigt dagegen die rotatorische Beweglichkeit (charakterisiert durch die  $T_I$ -Relaxationszeit) stärker als die translatorische Beweglichkeit (Selbstdiffusionskoeffizient  $D$ ). Die Selbstdiffusion erreicht bei etwa 150 MPa ihr Maximum, die rotatorische Beweglichkeit dagegen erst bei 250 MPa. Danach ähnelt das Verhalten wieder dem normaler Flüssigkeiten.

Diese Anomalie kann nur qualitativ erklärt werden. Sie resultiert aus der offenen tetraedrischen Netzwerkstruktur des flüssigen Wassers, die sich mit fallender Temperatur immer mehr an die perfekte Struktur annähert. Die Struktur folgt aus der Eigenschaft des Wassers, sich mit seinen zwei freien Elektronenpaaren und den beiden Wasserstoffatomen an der Netzbildung zu beteiligen.

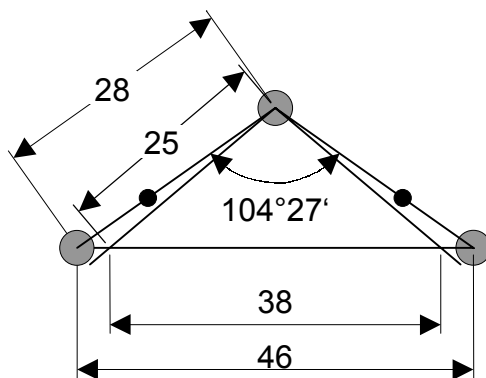


Abb.3.10. In der Tetraederstruktur des Wassers verändert sich unter Druck der Abstand übernächster Sauerstoffatome (grau) stark, während der Abstand zum Zentralmolekül nahezu konstant bleibt. Wasserstoff ist schwarz eingezeichnet. Die Kernabstände sind in willkürlichen Einheiten angegeben.

Da die Packungsdichte dieser offenen Struktur relativ niedrig ist und abnehmende thermische Energie die Moleküle in diese Struktur zwingt, verbleiben nur wenige gut definierte Ordnungszustände, die durch hohe Potentialwälle separiert werden. Dies führt zu einer

Verlangsamung der Diffusion mit fallender Temperatur. Mit steigendem Druck rücken die übernächsten Nachbarn näher zusammen, ohne dass die Bindungsabstände zum Zentralkern nennenswert beeinflusst werden (Abb.3.10.). Die mittleren O-O-O Kernabstände werden etwas verkürzt und weichen stärker von der energetisch optimalen Tetraederstruktur ab (die Lage der Wasserstoffatome ist nicht zwangsläufig auf die O-O Kernverbindungsvektoren beschränkt). Damit reduziert sich die Tiefe der Potentialtöpfe in denen sich die Wassermoleküle befinden und Translation wie Rotation werden erleichtert. Die Reduktion des Abstandes übernächster Nachbarn führt dann zunächst nur zu einer Behinderung der translatorischen Mobilität, die Rotation wird erst bei höheren Drücken eingeschränkt. (Lüdemann 2001)

Diese Eigenschaften des Wassers haben direkten Einfluß auf die Spektren von Biopolymeren in der NMR. Für den Bereich oberhalb 300 K nimmt die Viskosität des Wassers mit dem Druck zu, was an der stetigen Abnahme der Diffusionskonstante und Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$  zu erkennen ist. Dies bedeutet, dass mit steigendem Druck die Linien in den Spektren breiter werden, da die Proteine aufgrund der höheren Viskosität nur noch langsamer rotieren, d.h. die rotatorische Korrelationszeit  $\tau_c$  steigt an. Bei niedrigeren Temperaturen nimmt die Viskosität zunächst ab, um dann auch wieder zu steigen. Die Maxima der Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$  und Diffusionskonstante liegen, wie oben dargelegt, bei 250 MPa respektive 150 MPa, damit liegt dann auch das Minimum von  $\tau_c$  um 200 MPa, hier sollten die schmalsten Linien in den Proteinspektren liegen.

Aus den Graphen der  $T_1$ -Relaxation und Diffusion könnte geschlossen werden, dass der Ordnungsgrad des Wassers bei Temperaturen unterhalb von 300 K mit steigendem Druck zunächst abnimmt und dann wie bei Temperaturen oberhalb von 300 K durch steigende Packungsdichte wieder zunehmen könnte. Grundsätzlich werden jedoch wie oben erwähnt die Wasserstoffbrückenbindungen mit steigendem Druck aufgebrochen, da der Tetraederwinkel der O-O-O Kernverbindungsvektoren aus der energetisch optimalen Lage verschoben wird. Die mit dem Aufbrechen der Wasserstoffbrücken einhergehende Steigerung der Beweglichkeit einzelner Moleküle ist ein Faktor, der die Hydratisierung hydrophober Seitenketten mit steigendem Druck forciert. Ein erhöhter Ordnungsgrad des Wassers ist durch Reduktion der Wasserstoffbrücken nicht gegeben, entropische Effekte sind daher nicht zur Erklärung der Proteinentfaltung geeignet.

## 4. Druckabhängigkeit des Modellpeptidsystems H-Gly-Gly-X-Ala-OH

Die NMR an Proteinen bedient sich häufig der in Datenbanken tabellierten Werte von chemischen Verschiebungen in verschiedenen Proteinen, um durch Vergleiche homologer Sequenzen Aussagen über Struktur und Faltung treffen zu können. Seit Ende der Siebziger Jahre wurden jedoch auch zahlreiche Daten von Modellpeptiden veröffentlicht, um vergleichbare Bedingungen für jede Aminosäure zu schaffen (z.B. Wüthrich 1976, Wishart et al. 1995a, Schlemmer et al. 1988). All diese Arbeiten sind im Bestreben begründet die spezifisch strukturbedingten Anteile der chemischen Verschiebungen in Proteinen sowohl qualitativ als auch quantitativ beschreiben zu können.

Die Tetrapeptide H-Gly-Gly-X-Ala-OH wurden erstmals von Wüthrich (1976) als Modellsystem für ungefaltete Proteine (Random Coil) vorgeschlagen und werden im Folgenden um Daten zur Druckabhängigkeit der  $^1\text{H}$ -Verschiebungen im Bereich von 0,1 bis 200 MPa ergänzt.

### 4.1. Materialien und Methoden

#### 4.1.1. Vorbereitung der Proben und Zusammensetzung der Stammlösungen

Die Tetrapeptide H-Gly-Gly-X-Ala-OH mit Cys, Gly, Ala, Arg, Glu, His und Pro an Position 3 wurden von Fa. Bachem A.G. Liestal/Schweiz bezogen. Alle übrigen wurden am Universitätsklinikum Regensburg (A. Brunner, S. Modrow) synthetisiert. Die Qualität aller 20 Tetrapeptide wurde mittels Massenspektroskopie überprüft (E. Hochmuth), nennenswerte Verunreinigungen konnten dabei nicht festgestellt werden.

Die verwendeten Stammlösungen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Lösungen mit 99 %  $\text{D}_2\text{O}$  wurden durch Gefriertrocknung der Lösungen mit gleichem pH und anschließendem Wiederauffüllen mit 99 %  $\text{D}_2\text{O}$  hergestellt, die durch den Isotopeneffekt bedingte Verschiebung des pH wurde nicht korrigiert. Die pH Messung erfolgte mit Glaselektrode (761 Calimatic von Fa. Knick).

Nr.	GGXA	Puffer	Konz.	pH	DSS	$\text{D}_2\text{O}$	$\text{NaN}_3$
1	5 mM	Phosphat	50 mM	5,0	0,5 mM	20%	1 $\mu\text{M}$
2	5 mM	Phosphat	50 mM	5,0	0,5 mM	99%	1 $\mu\text{M}$
3	5 mM	Phosphat	50 mM	5,4	0,5 mM	20%	1 $\mu\text{M}$
4	5 mM	Phosphat	50 mM	5,4	0,5 mM	99%	1 $\mu\text{M}$
5	5 mM	Phosphat	50 mM	6,2	0,5 mM	20%	1 $\mu\text{M}$
6	5 mM	Phosphat	50 mM	7,0	0,5 mM	20%	1 $\mu\text{M}$
7	5 mM	Tris/HCl	50 mM	7,0	0,1 mM	10%	1 $\mu\text{M}$
8	5 mM	Tris/HCl	50 mM	7,0	0,1 mM	99%	1 $\mu\text{M}$

Tab.4.1. Zusammensetzung der Stammlösungen die zu den NMR-Hochdruckmessungen verwendet wurden.

#### 4.1.2. Ausführung der NMR-Messungen

Die Messungen am Bruker DMX 500 MHz Spektrometer erfolgten mit 10 mm  $^1\text{H}$ -Probenkopf, soweit 5 mm Borosilikatglaskapillaren verwendet wurden. Bei Anwendung der neuen 3 mm Hochdrucksaphirzellen konnte mit einem 5 mm Tripelresonanzkopf gemessen werden, was nicht nur das absolute Probenvolumen verdoppelte, sondern auch den Füllfaktor erheblich verbesserte. Für Messungen am Bruker DRX 600 MHz Spektrometer wurde ein 8 mm Tripelresonanzkopf eingesetzt.

Die Drift des Hauptmagneten wurde durch Nachführung des Feldes auf das  $\text{D}_2\text{O}$  Locksignal kompensiert. Die chemischen Verschiebung wurde auf DSS referenziert.

Die Messung der Spektren von nicht austauschenden  $^1\text{H}$ -Signalen erfolgte mit einem  $90^\circ$  Puls nach Einstrahlung eines Pulses niedriger Leistung von 1 s Länge zur Unterdrückung des Wassersignals. Um Signalverluste durch Vorsättigung der mit Wasser austauschenden Protonen bei hohem pH zu vermeiden, wurden zusätzliche Spektren mit einer 3-9-19 Gradienten Pulsfolge nach den Ausführungen von Piotto et al. (1992) und Sklenar et al. (1993) zur Wasserunterdrückung aufgenommen.

Zur Zuordnung der Signale in den 1D-Spektren wurden einerseits die tabellierten Werte der chemischen Verschiebung von Bundi und Wüthrich (1979b) genutzt, andererseits auch TOCSY-Spektren zur Identifikation zusammenhängender Spinsysteme. Die TOCSY-Spektren wurden gemäß Braunschweiler und Ernst (1991) mit 50 ms MLEV17 Spin-Lock-Puls nach Bax und Davis (1985) aufgezeichnet. TOCSY-Messungen zur Zuordnung der Spinsysteme wurden bei Normaldruck in Standard 5 mm Probenrohren (Wilma 524-PP-7) durchgeführt.

Die Speichertiefe der  $^1\text{H}$ -1D-Spektren betrug in der Regel 16 kByte bei 512 Einzelmessungen innerhalb einer Messzeit von etwa 20 min pro Druckstufe. Pro Tetrapeptid wurde bei fünf Druckstufen von 0,1 MPa bis 200 MPa in Schritten von 50 MPa gemessen, um Nichtlinearitäten zweifelsfrei quantifizieren zu können. Spektrale Auswertung und Bestimmung der chemischen Verschiebungen aus der Signalposition erfolgte mit dem Programm XWIN-NMR 2.6 von Bruker, die Datenauswertung mit dem Programm EXCEL (Microsoft) und ORIGIN 6.0 (Microcal).

Zur Einstellung des Drucks wurde die in Kapitel 2 beschriebene handbetriebene Spindelpresse verwendet und mit Hilfe eines Bourdon-Manometers der Genauigkeitsklasse 0,1 ( $\pm 0,6$  MPa) überprüft. Da die Schutzhüllen und die Wandstärke der Hochdruckkapillaren den Wärmeübergang zwischen Heizluftstrom und Probe behindern, wurde für beide Spektrometer eine Kalibrierung der Temperatur nach den Angaben von Raiford (1979) über den Abstand der chemischen Verschiebung  $\Delta\delta$  der Hydroxyl- und Methyllinien von Methanol vorgenommen. Im Bereich von 250 K bis 320 K ergibt sich die Proben temperatur aus Gl.4.1. Die Methanolprobe befand sich in einem identischen Aufbau wie die Tetrapeptidproben bei Hochdruckmessungen.

$$T(K) = 403,0 - 29,53 \cdot \Delta\delta - 23,87 \cdot (\Delta\delta)^2 \quad (\text{Gl.4.1.})$$



### 4.1.3. Darstellung der Messwerte und Fehlerangaben

In den folgenden Abschnitten werden Messreihen der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit des Druckes durchgeführt, dabei liegen meist fünf Messwerte bei fünf verschiedenen Druckstufen vor. Für die gemessenen chemischen Verschiebungen werden die Druckkoeffizienten mit einem linearen Fit.

$$\delta(p_k) = \delta_0 + \delta_1(p_k - p_0) \quad (\text{Gl. 4.2.})$$

und teilweise mit einem quadratischen Polynom bestimmt.

$$\delta'(p_k) = \delta'_0 + \delta'_1(p_k - p_0) + \delta'_2(p_k - p_0)^2 \quad (\text{Gl. 4.3.})$$

Hier ist  $\delta_0$  [ppm] die chemische Verschiebung bei Normaldruck ( $0,1 \cdot 10^{-3}$  GPa),  $\delta_1$  [ppm·GPa<sup>-1</sup>] der lineare Druckkoeffizient der chemischen Verschiebung, sowie  $\delta'_1$  [ppm·GPa<sup>-1</sup>] und  $\delta'_2$  [ppm·GPa<sup>-2</sup>] die Koeffizienten erster und zweiter Ordnung der nicht linear druckabhängigen chemischen Verschiebungen. Die Ermittlung der Koeffizienten erfolgte durch lineare und quadratische Regressionsanalyse.

Unter der Annahme, dass die Messung des Druckes mit einem vernachlässigbaren Fehler behaftet ist, ergibt sich der Fehler für  $\delta_0$  bzw. für  $\delta(p)$  an beliebigen Zwischenwerten aus der Standardabweichung  $\sigma$  der gemessenen Werte zu der berechneten Regressionsgeraden. Im Folgenden ist jedoch der Fehler  $\Delta\delta_1$  für die Steigung entscheidend, der nach Gl.4.4. berechnet werden kann (Squires 1971).

$$\Delta\delta_1 = \frac{\sigma}{\sqrt{\sum (p_k - \bar{p})^2}} = \frac{\sigma}{\sqrt{D}} \quad (\text{Gl. 4.4.})$$

Da immer die gleichen Druckstufen ( $p_k = 0,1 \cdot 10^{-3} / 0,05 / 0,10 / 0,15 / 0,20$  GPa mit  $k=1-5$ ) verwendet werden, ergibt sich für  $D = 2,5 \cdot 10^{-2}$  GPa<sup>2</sup>. In den folgenden Tabellen der linearen Druckabhängigkeiten sind grundsätzlich nur die Steigungsfehler angegeben.

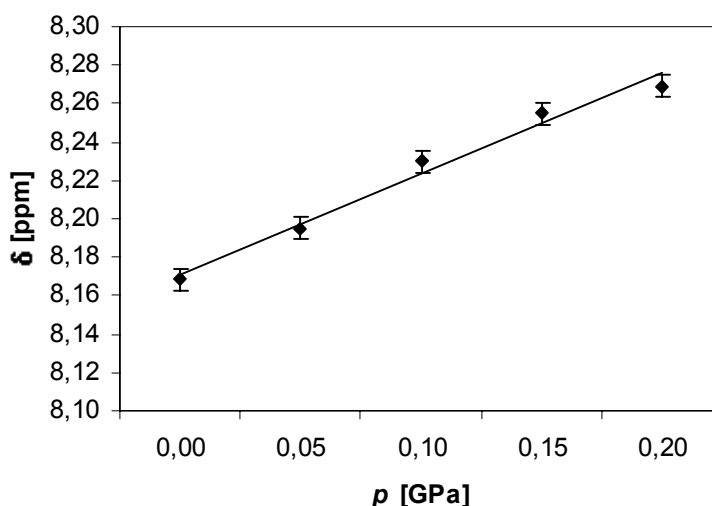


Abb.4.1. Darstellung der chemischen Verschiebung  $\delta$  [ppm] des  $\text{H}^{\text{N}}$ -Protons von Val3 im Tetrapeptid GGVA in Abhängigkeit des Druckes an fünf Messpunkten. Die eingetragenen Fehlerbalken entsprechen  $\pm 0,006$  ppm, der Druckkoeffizient ist  $0,52 \pm 0,04$  ppm GPa<sup>-1</sup>.

## 4.2. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der diversen Messreihen am ungefalteten Modellpeptid H-Gly-Gly-X-Ala-OH im Einzelnen vorgestellt. Die tabellierten Koeffizienten der linearen und quadratischen Näherungen sind in diesem Kapitel zu finden. Im Text sind die Daten nur auszugsweise dargestellt, soweit dies für die Beschreibung der beobachteten Effekte notwendig ist.

Die Bezeichnungen von Atomen in den Seitenketten der Tetrapeptide entsprechen den IUPAC Vorgaben zur Notation (Markley et al. 1998).

### 4.2.1. Messungen in Phosphatpuffer und Einfluss des pH

Die Tetrapeptide H-Gly-Gly-X-Ala-OH liegen aufgrund der geringen Länge als Molekül ohne klar definierbare Sekundärstruktur vor, da die Drehung um die  $\varphi$  und  $\psi$  Winkel des Peptidrückgrates sterisch wenig gehemmt wird. Die durch fehlende Sekundärstrukturelemente exponierte Lage der an O, S oder N Kerne gebundenen Protonen begünstigt den Austausch mit dem umgebenden Wasser, da nur wenige Möglichkeiten innerhalb des Peptides zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken gegeben sind, die das Proton in seiner Position fixieren könnten. Auch die Ausbildung größerer hydrophober Kavitäten wird durch die geringe Länge des Peptides verhindert. Von besonderem Wert zur Beurteilung von Wasserstoffbrücken sind die Amidprotonen in der Peptidbindung.

Die Austauschraten sind abhängig vom pH der Lösung, je niedriger dieser liegt, umso geringer sind die Raten. Erfolgt der Austausch schneller als die  $T_2$ -Relaxation, führt dies zu einer Verbreiterung des NMR-Signals und damit letztendlich zu seinem Verschwinden. Die Austauschraten  $k$  der Protonen der Amidbindung können aus der Sequenz der Aminosäuren im Peptid in Abhängigkeit von Temperatur und pH mit Hilfe einer von Bai und Englander (1993) erstellten EXCEL-Kalkulationstabelle berechnet werden. Für die hier verwendeten Tetrapeptide sind die errechneten Raten für die Residuen Gly2 und X3, sowie des C-terminalen Ala4 in Tabelle 4.2. zusammengestellt. Die Austauschrate eines  $H^N$ -Protons in der Peptidbindung wird im Wesentlichen von der vorhergehenden Aminosäure bestimmt (Bai & Englander 1993), was an den stets gleichen Werten für Gly2 deutlich wird.

Die Tabelle zeigt, dass im physiologisch interessanten Bereich die Austauschraten stark anwachsen und dazu führen, dass die Linien teilweise nicht mehr sichtbar sind, bzw. mit den meist direkt benachbarten  $H^N$ -Linien des Ala4 überlappen. Daher wurde zunächst mit Phosphatpuffer an der äußersten Grenze des Pufferbereiches analog zur Arbeit von Wishart et al. (1994) die Druckabhängigkeit der verschiedenen Tetrapeptide vermessen.

Der  $pK_a$  des Phosphatpuffers ist jedoch druckabhängig, da die Summe der scheinbaren Molvolumina zwischen dissoziiertem und nichtdissoziiertem Zustand unterschiedlich sind und damit nach dem Le Chatelier'schen Prinzip vom kleinsten Zwang das Gleichgewicht entsprechend verschoben wird. Die Verschiebung des  $pK_a$  kann indirekt durch dilatometrische Messungen der Reaktionsvolumina (Kitamura & Itoh 1985), oder direkt z.B. mit optischen Indikatoren wie Nitrophenol (Neuman, Kauzmann, Zipp 1973, sowie Hitchens, Bryant 1997) in geeigneten Hochdruckautoklaven bestimmt werden. Die Druckabhängigkeit des Phosphatpuffers führt nach diesen Arbeiten zu einer Verschiebung des pH um  $\delta pH = -0,4$  pro 0,1 GPa.

k [1/s]	Gly2		X3		Ala4	
X3	pH=5,0	pH=7,0	pH=5,0	pH=7,0	pH=5,0	pH=7,0
Ala	6,2	600,1	0,08	7,78	0,05	5,26
Arg	6,2	600,1	0,10	9,28	0,09	8,73
Asn	6,2	600,1	0,25	24,04	0,11	10,99
Asp	6,2	600,1	0,11	3,99	0,07	3,52
Cys	6,2	600,1	0,34	32,43	0,19	18,66
Gln	6,2	600,1	0,09	8,93	0,09	8,34
Glu	6,2	600,1	0,07	2,48	0,08	3,79
Gly	6,2	600,1	0,15	14,39	0,08	7,78
His	6,2	600,1	0,50	25,12	0,36	19,76
Ile	6,2	600,1	0,02	1,45	0,03	3,10
Leu	6,2	600,1	0,02	2,06	0,03	3,24
Lys	6,2	600,1	0,07	7,09	0,07	6,93
Met	6,2	600,1	0,08	7,62	0,07	6,78
Phe	6,2	600,1	0,05	4,52	0,06	6,08
Pro	6,2	600,1			0,03	3,03
Ser	6,2	600,1	0,19	18,24	0,11	10,48
Thr	6,2	600,1	0,07	6,68	0,09	8,34
Trp	6,2	600,1	0,03	3,03	0,04	4,08
Tyr	6,2	600,1	0,04	4,18	0,06	5,90
Val	6,2	600,1	0,02	1,55	0,04	3,81

Tab.4.2. Austauschraten  $k$  der Amidprotonen von Gly2, X3 und Ala4 bei pH 5,0 und 7,0 ( $T = 305$  K) in der Peptidbindung der Tetrapeptide GGXA, berechnet nach der Methode von Bai und Englander (1993). Je nach Verfahren der Wasserunterdrückung sind bei hohem pH nicht mehr alle Signale messbar, da mit steigendem pH der Austausch zunimmt.

Die Druckabhängigkeit des Phosphatpuffers erschwert die Messung der rein druckinduzierten Variationen der chemischen Verschiebung in den Tetrapeptiden erheblich. Um beide Effekte trennen zu können, wurden Druckreihen von 0,1 MPa bis 200 MPa in Schritten von 50 MPa bei den pH Werten von 5,0 und 5,4 gemessen. Aus dem Abstand der Druckverläufe der chemischen Verschiebungen ergibt sich die pH Abhängigkeit. Zusätzlich bietet die doppelte Vermessung auch eine gute Redundanz um Fehler in der Druckapparatur zu erkennen. In Abb.4.2. sind die Änderungen der chemischen Verschiebung  $\Delta\delta$  der  $H^N$ -Protonen der Aminosäure X3 im Tetrapeptid GGXA bei Variation des Druckes von 0,1 MPa auf 200 MPa ( $\Delta\delta = \delta_{0,1 \text{ MPa}} - \delta_{100 \text{ MPa}}$ ) im Vergleich zur Änderung der chemischen Verschiebung  $\Delta\delta$ , die durch Variation des pH-Wertes von 5,0 auf 5,4 ( $\Delta\delta = \delta_{pH5,0} - \delta_{pH5,4}$ ) bedingt wird, aufgetragen. Die durch Variation des Drucks entstandenen Werte von  $\Delta\delta$  in Abb.4.2. wurden bei pH 5,4 vermessen.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, dominiert der Druckeffekt auf die chemischen Verschiebungen im pH-Bereich zwischen 5,0 und 5,4 weitgehend den pH-Effekt mit Ausnahme von Glutaminsäure, die nahezu keinen Druckeffekt aufweist. Auf dieses Verhalten von Glutamat wird später eingegangen.

Als zusätzliche Fehlerquelle ist die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen zu berücksichtigen. Da die Temperaturregelung im Spektrometer, trotz sorgfältiger Einstellung von Vorlauftemperatur und Luftmenge, mit einem Absolutfehler von  $\pm 1$  K behaftet ist. Für das Pentapeptid GGXGG, ähnlich den hier verwendeten Tetrapeptiden GGXA, liegt der Temperaturkoeffizient von Amidprotonen nach Merutka et al. (1994) im Mittel um  $0,008 \text{ ppm K}^{-1}$ , was in der Größenordnung der hier gezeigten Schwankungen der

pH Abhängigkeit liegt. Der absolute Temperaturfehler ist bei Vergleich verschiedener Messreihen zu beachten, ist aber unbedeutend innerhalb einer Druckreihe.

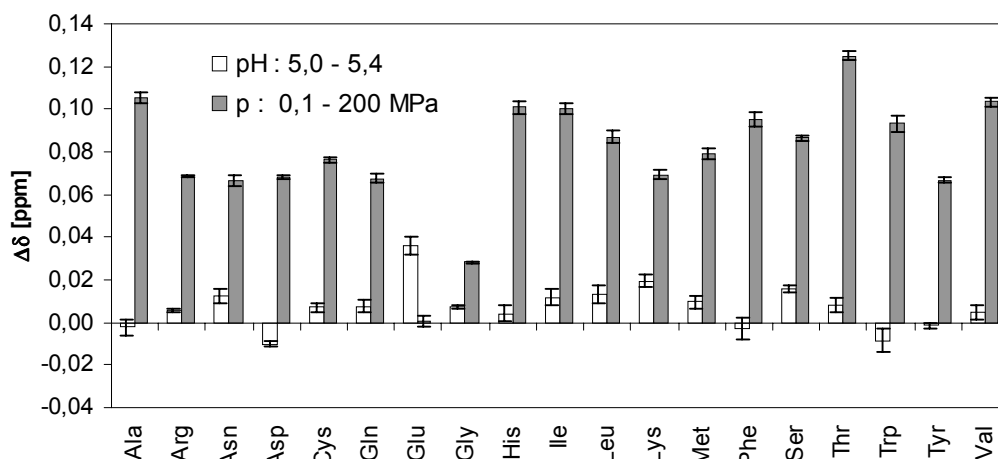


Abb.4.2. Vergleich der Differenzen der chemischen Verschiebungen ( $\Delta\delta = \delta_{\text{pH}5,0} - \delta_{\text{pH}5,4}$ ) bei pH 5,0 und pH 5,4 mit der Differenz ( $\Delta\delta = \delta_{0,1 \text{ MPa}} - \delta_{100 \text{ MPa}}$ ) bei 0,1 MPa und 200 MPa. Dargestellt sind die Resonanzen der  $\text{H}^{\text{N}}$ -Protonen an Position 3 des Tetrapeptides GGXA in Phosphatpuffer. Bei den meisten Aminosäuren dominiert die druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung über die pH bedingten Änderungen.

Um die Einflüsse des pH widerspruchsfrei zu klassifizieren sind Titrationsreihen nötig. Diese wurden teilweise von Wüthrich (1979a, b) für die  $\text{H}^{\text{N}}$ -Protonen der Peptidbindungen und Seitenketten für die Tetrapeptide GGXA ermittelt. Für einige  $\text{H}^{\text{N}}$ -Protonen können aufgrund des Austausches mit dem Lösungsmittel Wasser keine vollständigen Titrationskurven angegeben werden, der Einfluss des unterschiedlichen Protonierungsgrades des Stickstoffs der Peptidbindungen, wie auch von austauschenden Seitenketten, kann jedoch durch Betrachtung des Verhaltens benachbarter Protonen erkannt werden. In Abb.4.3. sind die Titrationskurven der C-gebundenen Imidazolringprotonen im Peptid GGHA dargestellt, deren pH Abhängigkeit durch eine Gleichgewichtsverschiebung zwischen dissoziiertem und nichtdissoziiertem Zustand bedingt wird.

Gly-Gly-His-Ala [ppm]		Phosphatpuffer					
		pH=5,0 20% D <sub>2</sub> O	pH=5,0 99% D <sub>2</sub> O	pH=5,4 20% D <sub>2</sub> O	pH=5,4 99% D <sub>2</sub> O	pH=6,2 20% D <sub>2</sub> O	pH=7,0 20% D <sub>2</sub> O
His3	$\text{H}^{\delta 2}$	7,3114	7,3105	7,3052	7,3189	7,3090	7,1235
His3	$\text{H}^{\epsilon 1}$	8,5512	8,5459	8,5324	8,5629	8,5437	8,1128

Tab.4.3. Die chemische Verschiebung der Ringprotonen hängt um den  $\text{pK}_a$ -Wert der stickstoffgebundenen Seitenkettenprotonen stark vom pH bzw. pD für die deuterierten Proben, der Lösung ab.

Die durchgezogenen Kurven wurden aus den Daten von Wüthrich (1979a) für den Seitenketten  $\text{pK}_a$  des Histidins und die chemische Verschiebung an beiden Enden des sigmoiden Graphen berechnet. Die Berechnung der chemischen Verschiebung aus  $\text{pK}_a$  und der chemischen Verschiebung im protonierten ( $\delta_{\text{AH}}$ ) wie dissoziierten Zustand ( $\delta_{\text{A}^-}$ ) erfolgt mit der modifizierten Henderson Hasselbalch Gleichung (Hausser & Kalbitzer 1991) Gl.4.5. Die notwendigen Parameter für Histidin sind in Tab.4.4. zu finden.

His3	$\delta_{AH}$ [ppm]	$\delta_{A-}$ [ppm]	$pK_a$
H <sup><math>\epsilon</math>1</sup>	8,613	7,747	7,0
H <sup><math>\delta</math>2</sup>	7,348	6,966	

Tab.4.4. Die Werte der chemischen Verschiebung im protonierten ( $\delta_{AH}$ ) wie dissoziierten Zustand ( $\delta_{A-}$ ), sowie der Seitenketten  $pK_a$ -Wert des Tetrapeptids GGHA zur Berechnung der Titrationskurven in Abb.4.3. wurden der Arbeit von Wüthrich und Bundi (1979a) entnommen.

$$\delta = \delta_{AH} + (\delta_{A-} - \delta_{AH}) \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (Gl.4.5.)$$

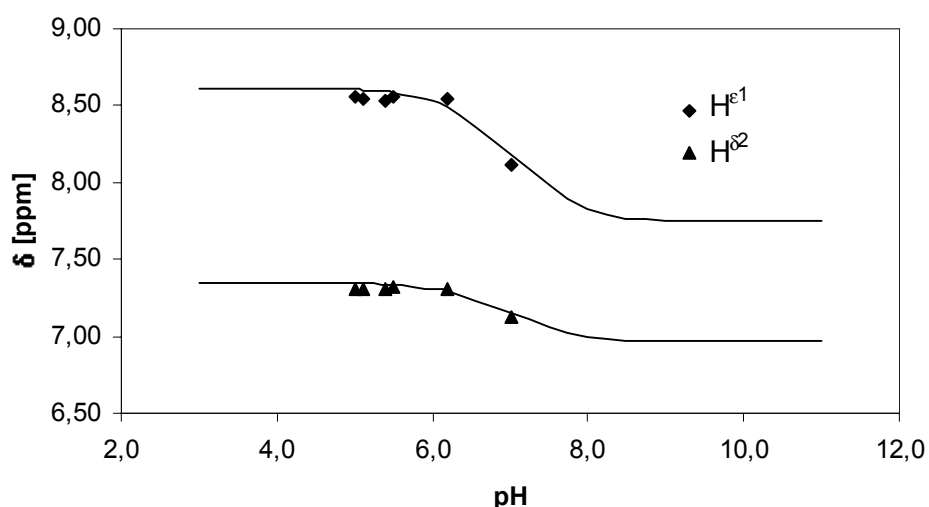


Abb.4.3. Titrationskurve der Seitenketten Protonen des Histidins im Peptid GGHA. Die durchgezogenen Linien sind mit Gl.4.5. berechnet, die fett eingetragenen Punkte sind Messwerte der Peptidlösung aufgenommen in Hochdruckzellen bei Normaldruck.

Da für das Locksignal zur Nachführung des Magnetfeldes des Spektrometers in der Probe  $D_2O$  benötigt wird, ist es notwendig den Isotopeneffekt des Deuteriums bei der Messung mit Glaselektroden zu beachten. Nach Glasoe (1960) ist der  $pD = pH_{\text{gemessen}} + 0,4$ , in der NMR an Biomolekülen ist man jedoch hauptsächlich an der Acidität von ionisierbaren Gruppen interessiert (Wüthrich 1979a), weshalb auch der Isotopeneffekt des  $pK_a$  vom Protein bzw. dem Peptid beachtet werden muss. Letztlich ergibt sich Gl.4.6. von Kalinichenko (1976), wobei die  $pK_a$  um 0,4 liegen, was letztendlich zu einer Kompensation beider Werte führt.

$$pD = pH_{\text{gemessen}} + 0,4 - \Delta pK_a \quad (Gl.4.6.)$$

Der in Tabelle 4.3. und Abb. 4.3. dargestellte pH-Effekt ist im hier vermessenen pH- Bereich von 5,0 bis 7,0 ausschließlich bei Histidin zu finden, die Seitenketten aller anderen ionisierbaren Aminosäuren liegen außerhalb dieses Bereichs, wie aus Tab.4.5. nach Daten von Wüthrich (1979a) ersichtlich ist. Die  $pK_a$  der Amidprotonen in der Peptidbindung liegen nach Angaben dieser Quelle im Bereich von 3 bis 4.

Die Lage des Seitenketten  $pK_a$  im physiologisch relevanten Bereichs um  $pH = 7,0$  erlaubt es der Zelle Histidin gebunden in Proteinen als Puffer zu verwenden. Beispielsweise befindet

sich diese Aminosäure in großer Zahl im sauerstoffbindenden Protein Hämoglobin der roten Blutzellen.

Gly-Gly-X-Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	His	Lys	Tyr	Ala C-tem
pK <sub>a</sub> (Wüthrich 1979a)		3,9		4,3	7,0	11,1	10,3	3,3
pK <sub>a</sub> (Lehninger 1993)	12,5	3,9	8,3	4,3	6,0	10,5	10,1	2,3

Tab.4.5. pK<sub>a</sub>-Werte der Seitenketten des Peptides GGXA (Wüthrich 1979a) und von Aminosäuren (Lehninger 1993). Nur der pK<sub>a</sub>-Wert der Seitenkette des Histidins liegt im physiologisch relevanten pH-Bereich um 7,0.

#### 4.2.2. Vergleich von Tris/HCl- und Phosphatpuffer

Wie schon anhand von Abb. 4.2. gezeigt wurde, ist die pH Abhängigkeit der Peptide GGXA im Bereich von 5,0 bis 5,4 im Vergleich zu Druckeffekten eher gering. Bei pH 7,0 sollten sich jedoch zumindest bei Histidin die Wirkung des pH deutlich bemerkbar machen. Statt wieder bei zwei pH-Werten zu messen, ist es hier möglich Tris/HCl als Puffer zu verwenden. Analog zum Phosphatpuffer wurde die Druckunabhängigkeit sowohl mittels Dilatometer über das Reaktionsvolumen durch Kitamura und Itoh (1985), als auch über optische Indikatoren durch Neuman, Kauzmann und Zipp (1973), sowie Hitchens, Bryant (1997) bewiesen.

Die Unabhängigkeit von Tris/HCl bei Druckänderungen ist in der konstanten Anzahl von Ladungsträgern bei Dissoziation begründet (Neuman, Kauzmann, Zipp 1973).

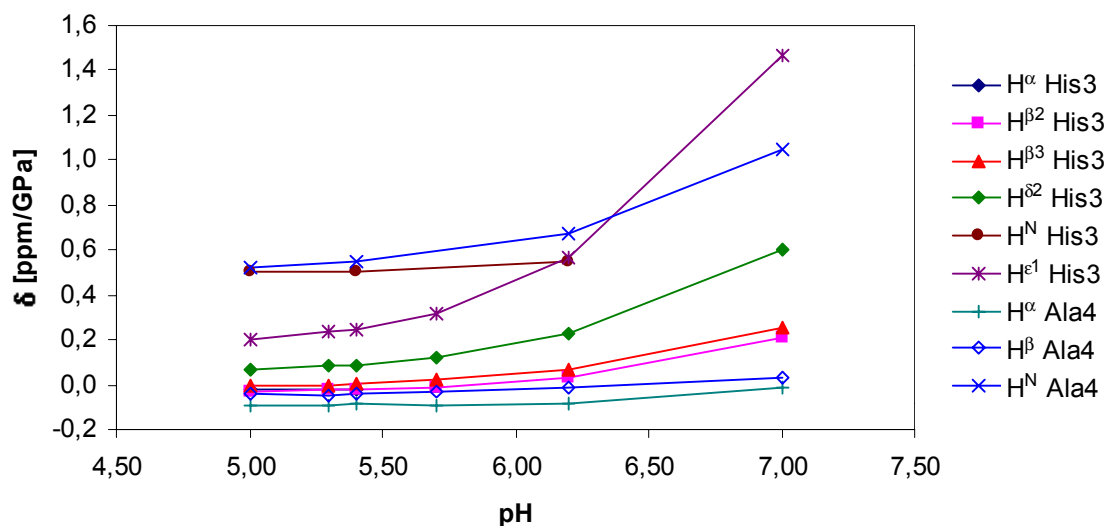
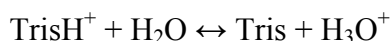


Abb.4.4. Lineare druckinduzierte Änderungen  $\delta_1$  der chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ -Resonanzen des Peptides GGHA in Phosphatpuffer. Die Linie des  $\text{H}^{\text{N}}$ -Protons von His3 konnte wegen Austauschverbreiterung nur bis zu pH 6,2 verfolgt werden, dennoch ist erkennbar, dass die Druckabhängigkeit erheblich geringer ist, als die der  $\text{H}^{\text{N}}$ -Linie des Ala4, das sterisch nahe zum Imidazolring des Histidins liegt. Die Ringprotonen  $\text{H}^{\epsilon 1}$  und  $\text{H}^{\delta 2}$  zeigen ebenfalls starke Variationen der chemischen Verschiebung mit dem Druck.

Gly-Gly-His-Ala [ppm/GPa]		Phosphat						Tris
		pH=5,0 20% D <sub>2</sub> O	pH=5,0 99% D <sub>2</sub> O	pH=5,4 20% D <sub>2</sub> O	pH=5,4 99% D <sub>2</sub> O	pH=6,2 20% D <sub>2</sub> O	pH=7,0 20% D <sub>2</sub> O	pH=7,0 10% D <sub>2</sub> O
His3	H <sup>α</sup>		-0,024		-0,020			-0,026
His3	H <sup>β2</sup>	-0,030	-0,024	-0,025	-0,011	0,036	0,212	-0,064
His3	H <sup>β3</sup>	-0,004	0,000	0,006	0,021	0,071	0,254	-0,057
His3	H <sup>δ2</sup>	0,068	0,086	0,089	0,123	0,226	0,599	-0,046
His3	H <sup>ε1</sup>	0,202	0,236	0,243	0,318	0,564	1,465	0,601
His3	H <sup>N</sup>	0,505		0,502		0,552		
Ala4	H <sup>α</sup>	-0,097	-0,092	-0,087	-0,089	-0,081	-0,013	-0,068
Ala4	H <sup>β</sup>	-0,040	-0,050	-0,040	-0,034	-0,016	0,028	-0,024
Ala4	H <sup>N</sup>	0,518		0,550		0,673	1,050	-0,096

Tab.4.6. Vergleich der Druckabhängigkeiten in Phosphat und Tris/HCl Puffer des Peptides GGHA. Fehlende Werte sind entweder durch Austausch zu stark verbreitert, oder vom Wassersignal überdeckte H<sup>α</sup>-Protonen. Die Daten werden in Abb.4.4. dargestellt und kommentiert.

In Tab.4.6. sind die Druckabhängigkeiten in ppm GPa<sup>-1</sup> zum Vergleich in Phosphat und Tris/HCl-Puffer eingetragen, wie an den zugehörigen Graphen (Abb.4.4.) ersichtlich, nimmt die Druckabhängigkeit mit steigendem pH für Phosphatpuffer extrem zu.

Besonders starke Effekte zeigen hier die beiden Protonen des Imidazolrings, gefolgt von den beiden H<sup>β</sup>. Die Linien des Histidin-H<sup>α</sup>-Protons zeigen nahezu keinen Druckeffekt mehr wie auch die H<sup>α</sup> und H<sup>β</sup> des C-terminalen Alanins. Soweit sich in Abb.4.4. der Druckeffekt des Histidin-Amidprotons der Peptidbindung wegen zunehmendem Austausch bei steigendem pH verfolgen läßt, ist für dieses Proton kaum noch eine Beeinflussung durch den Ring gegeben. Im Gegensatz dazu steht der hohe Druckeffekt auf das Amidproton des Alanins, das dem Ring des Histidins sterisch sehr nahe kommt (Abb. 4.5.).

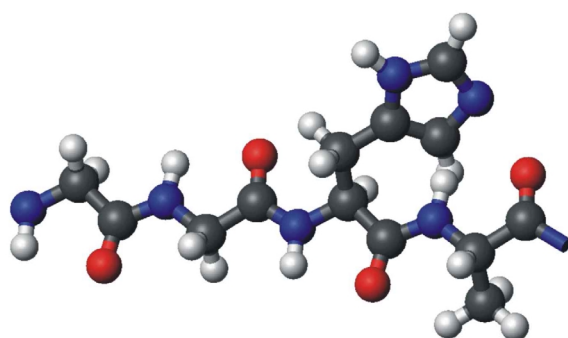


Abb.4.5. Das gestreckte Tetrapeptid Gly-Gly-His-Ala in dreidimensionaler Darstellung. Die H<sup>N</sup>-Protonen des Imidazolrings kommen dem Amidproton des Alanins sehr nahe. Das H<sup>N</sup>-Proton der Peptidbindung des Histidins liegt dagegen weit entfernt zum Ring. Die Abstände werden qualitativ durch die Verläufe der Kurven in Abb.4.4. wiedergegeben.

Unter Verwendung der modifizierten Henderson Hasselbalch Gleichung (Gl.4.5.) und der bekannten pH-Verschiebung von -0,4 ppm pro 100 MPa<sup>-1</sup> des Phosphatpuffers, kann der nicht pK<sub>a</sub> bedingte Druckeffekt bei pH 7,0 errechnet werden. Effektiv ergibt sich bei 200 MPa ein pH der Lösung von 6,2 und eine Änderung der chemischen Verschiebung um 0,139 ppm für H<sup>δ2</sup>, respektive 0,315 ppm für H<sup>ε</sup>. Dies entspricht einem durch Druckänderung bewirkten pH-Effekt von 0,695 ppm GPa<sup>-1</sup> (H<sup>δ2</sup>) und 1,575 ppm GPa<sup>-1</sup> (H<sup>ε</sup>). Die in Tab.4.6. dargestellten

Druckabhängigkeiten von  $H^{\delta 2}$  und  $H^{\epsilon}$  in Phosphatpuffer bei pH 7,0 sind die Summe aus Druck- und pH-Effekt. Den pH bereinigten Druckeffekt der  $H^{\delta 2}$  und  $H^{\epsilon}$  Signale erhält man aus den Messwerten durch Subtraktion des berechneten pH-Effekts  $H^{\delta 2}$ :  $0,599 - 0,695 = -0,096 \text{ ppm GPa}^{-1}$  und  $H^{\epsilon}$ :  $1,465 - 1,575 = -0,110 \text{ ppm GPa}^{-1}$ . Dies stimmt für  $H^{\delta 2}$  weitgehend mit dem Wert von  $-0,046 \text{ ppm GPa}^{-1}$  im Tris/HCl-Puffer überein (Tab.4.6), liegt aber vollkommen neben dem Wert von  $H^{\epsilon}$ , das in Tris einen Druckgradienten von  $0,601 \text{ ppm GPa}^{-1}$  aufweist. Allerdings setzt diese Abschätzung voraus, dass der  $pK_a$ -Wert von Histidin druckunabhängig ist. Dies ist eine Annahme, die sicher nicht ohne weiteres gerechtfertigt ist. Zum Vergleich von Phosphat- und Tris/HCl-Puffer wird in Abb.4.6. die Druckabhängigkeit der sensitiven  $H^N$ -Protonen des C-terminalen Alanins dargestellt. Alanin wurde gewählt, da Messwerte bei allen pH-Werten und allen Kombination der Tetrapeptide GGXA vorliegen. Wie sofort zu erkennen, sind sämtliche Werte innerhalb der Fehlergrenzen zwischen beiden Puffersystemen vergleichbar. Die einzige markante Ausnahme bildet Histidin, dessen Verhalten unter Berücksichtigung der obigen Ausführungen über den  $pK_a$  der Aminosäuren mit ionisierbaren Seitenketten verständlich ist. Danach sollte sich die pH-Abhängigkeit des Phosphatpuffers nur dann auswirken, wenn sich der  $pK_a$  von ionisierbaren Atomen in der Nähe des pH des Lösungsmittels befindet.

Betrachtet man alle Protonen des Histidins in den verschiedenen Lösungen und berücksichtigt die oben erwähnte Abweichung bei der Rückrechnung des pH bereinigten Druckeffektes von  $H^{\epsilon}$ , muss bezweifelt werden, dass das Verhalten alleine durch druckinduzierte pH-Verschiebungen des Systems aus Solvens, Puffer und Lösungsmittel erklärt wird. Abb. 4.7. zeigt, dass die massivsten Abweichungen zwischen Phosphatpuffer (pH 5,4) und Tris/HCl-Puffer (pH 7,0) im Bereich des Rings und beim Amidproton von Ala4 auftreten. Die Situation wird dadurch kompliziert, dass man vermuten kann, dass die Druckkoeffizienten des Histidinrings stark von seiner Ladung abhängen, da er bei niederem pH nur Donator von Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel sein kann. Bei hohem pH kann er zusätzlich eine Rolle als Akzeptor spielen. Wie Abb.4.5. verdeutlicht, liegt das Ala4  $H^N$ -Proton sterisch günstig zum Ring und ist deshalb ein empfindlicher Sensor für die Protonierung, oder auch der denkbaren Phosphorylierung einer der beiden Stickstoffe am Ring. Im aktiven Zentrum His15 des Proteins *HPr* und des Faktors *III<sup>lac</sup>*, der die Phosphorylierung von Lactose in verschiedenen Bakterienstämmen bewirkt, konnte Kalbitzer et al. (1981) eine Phosphorylierung des Histidins beweisen. Indiz für eine Phosphorylierung sollte nach dieser Quelle eine signifikante Änderung der chemischen Verschiebung des  $H^{\epsilon}$  Signals von  $\delta = 8,62 \text{ ppm}$  auf  $\delta = 8,47 \text{ ppm}$  sein, die hier jedoch nicht aufgefunden wurde. Zudem sollte die Druckanwendung dephosphorylierend wirken, da dies mit einem negativen Reaktionsvolumen durch Zunahme der Ladungsträger verbunden ist.

Eventuell ist die Ursache für diese Abweichungen auch nicht im Phosphatpuffer, sondern im Tris/HCl-Puffer begründet. Im Abschnitt über die Druckabhängigkeit der Signalvolumina zeigt Tab.4.13., dass das Signalvolumen in Tris/HCl (pH7,0) der  $H^{\epsilon}$ -Linie um den Faktor 2,6 mit steigendem Druck fällt, während es in Phosphat bei pH 6,2 im Rahmen des Fehlers konstant bleibt. Dies deutet auf die Ausbildung eines nicht kovalent gebundenen Assoziats mit Tris/HCl hin. Zwei mögliche Erklärungen sind :

- Die Bildung des Assoziates mit steigendem Druck wird begünstigt durch ein negatives Reaktionsvolumen.
- Durch zunehmenden Druck erhöht sich der Dissoziationsgrad der Ringamidprotonen, dadurch steigt die negative Ladungsdichte des Rings und das Assoziat bildet sich durch Coulombwechselwirkung.



Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Messungen der Druckabhängigkeit chemischer Verschiebungen von  $H^N$ -Protonen in Aminosäuren im physiologisch interessanten pH Bereich um 7,0 die gleichen Werte, sowohl in Phosphat- als auch Tris/HCl-Puffer liefern. Eine Ausnahme bildet Histidin, das in Phosphatpuffer empfindlich auf die druckinduzierte pH-Variation des Puffers reagiert. Die Seitenkette kann phosphoryliert werden, allerdings können auch in Tris/HCl-Puffer unerwünschte Wechselwirkungen des Histidins nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Seitenkette könnte möglicherweise bei hohem Druck phosphoryliert werden, obwohl bei Normaldruck die freie Enthalpie keine nennenswerte Phosphorylierung erlaubt. Eine andere Möglichkeit würde eine nichtkovalente Assoziation von Phosphat an das Tetrapeptid darstellen, oder es könnten unerwünschte Wechselwirkungen des Histidins in Tris/HCl-Puffer einen Einfluß auf die druckabhängigen Verschiebungen haben.

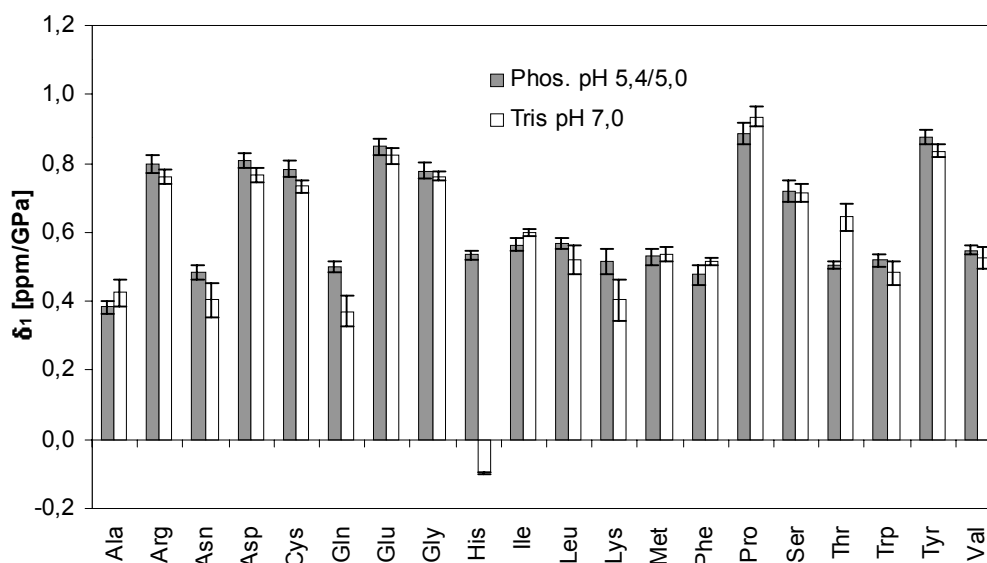


Abb.4.6. Lineare Druckkoeffizienten  $\delta_1$  der Amidprotonen des C-terminalen Ala4 der Tetrapeptide GGXA in Tris/HCl- und Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten. Erhebliche Unterschiede im Druckverhalten sind nur für GGHA aufgrund des Seitenketten  $pK_a$  von etwa 7,0 des Imidazolrings zu verzeichnen.

Zusätzlich sollte bei der Verwendung eines Puffersystems dessen Temperaturabhängigkeit betrachtet werden. Nach Rehm (2000) liegt der pH-Temperaturgradient von Tris/HCl bei  $0,028 \text{ K}^{-1}$  und der von Phosphatpuffer bei  $0,003 \text{ K}^{-1}$ . Damit ist Phosphatpuffer besser geeignet als Tris/HCl-Puffer, wenn die Temperatur variiert werden soll.

Weitere Puffer wurden nicht untersucht, da bei der Anwendung mit Proteinen zusätzlich noch die Verträglichkeit von Protein und Puffer bezüglich Aggregatbildung und denaturierenden Effekten zu berücksichtigen ist. Die hier genannten Puffer sind die gebräuchlichsten für die Messungen von Biopolymeren unter Hochdruck.

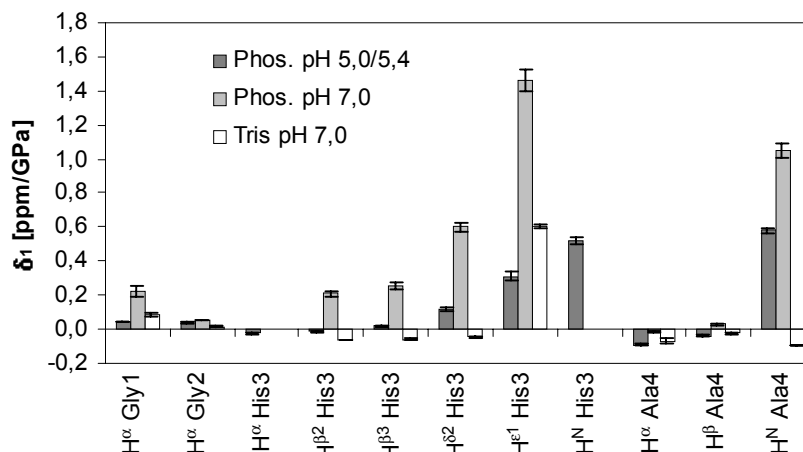


Abb.4.7. Vergleich der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen einzelner Kerne innerhalb von GGHA in Tris/HCl- und Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten. Starke Unterschiede treten bei allen Protonen auf, die dem Imidazolring des His3 sterisch nahe liegen.

Zur Vervollständigung des Bildes sei noch erwähnt, dass auch die innere Referenzsubstanz DSS potentiell einer Verschiebung mit zunehmendem Druck unterworfen sein könnte. Dies wurde jedoch von Kalbitzer et al. (2000) mit den Untersuchungen des Proteins *HPr* aus *S.carnosus* durch Vergleich verschiedener Substanzen, sowohl als innerer Referenz als auch gegenüber äußeren Referenzen widerlegt. Die Resonanzfrequenz von DSS kann daher als unveränderlich gegenüber Variationen des Druckes innerhalb des hier angewendeten Druckbereichs von maximal 0,2 GPa angesehen werden.

#### 4.2.3. Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen

Die größten druckinduzierten Änderungen der chemischen Verschiebung wurden in den  $^1\text{H}$ -Resonanzen der Peptidbindungen registriert. Beispiele für die aufgenommenen Spektren sind in Abb.4.8. dargestellt. Wie deutlich zu sehen, nimmt die Intensität der Linien mit zunehmendem pH ab, während die Linienbreite durch Austausch mit Wasser zunimmt, sodass sich die Qualität der Spektren der  $\text{H}^{\text{N}}$ -Protonen bei höherem pH verringert. Das linke Spektrum wurde mit einem Puls von einer Sekunde zur Wasserunterdrückung vorgesättigt, damit können nur Protonen in der Amidbindung zum Signal beitragen, die während der Aufnahmezeit nicht mit Wasser austauschen.

Da die Viskosität wie in Kapitel 3 erwähnt mit zunehmendem Druck abnimmt, werden die Linien zu hohem Druck hin durch schnellere Rotation des gesamten Tetrapeptides schmaler. Rechts wurde stattdessen ein 3-9-19 Gradientenpuls zur Wasserunterdrückung verwendet, damit können bei schnellerem Austausch auch Protonen aus dem Lösungsmittel zum Signal beitragen und die druckinduzierte Beschleunigung des Austausches wird sichtbar. Die Austauschraten werden weiter unten diskutiert.

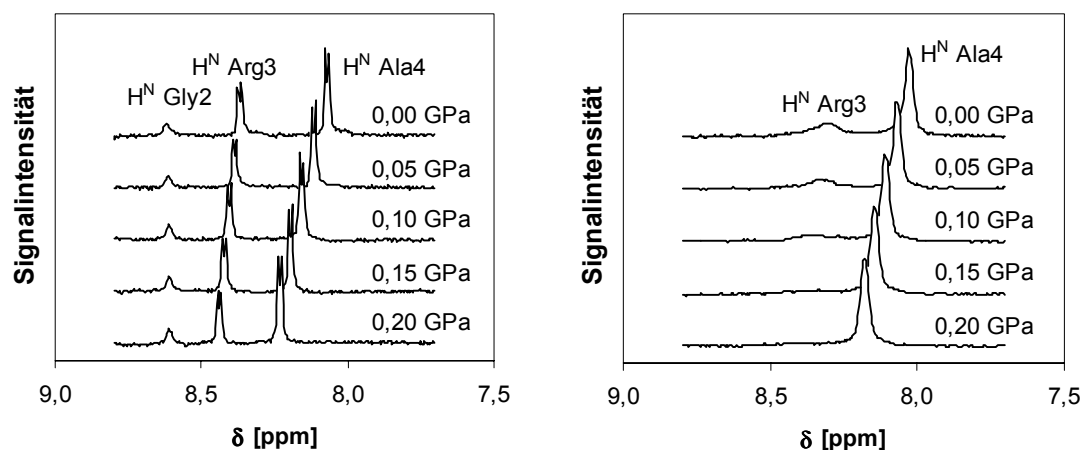


Abb.4.8. Spektren von GGRA links bei pH 5,4 rechts bei pH 7,0. Durch Austauschverbreiterung ist das Signal von Gly2 bei pH 7,0 vollkommen verschwunden, das Signal von Arg3 verschwindet mit steigendem Druck. Links wurde die Wasserlinie mit Vorsättigung unterdrückt, rechts mit 3-9-19 Gradientenpuls.

Mit Hilfe des Programms WinNMR von Bruker wurde die chemische Verschiebung der Signale bei den verschiedenen Druckstufen teils visuell, teils durch Anpassung einer Lorentzkurve an die Linienform bestimmt. In Tab.4.7. sind die chemischen Verschiebungen unter verschiedenen Pufferbedingungen aufgelistet. Die Darstellung der Daten in Abb.4.9. zeigt für Glu3 ein deutlich nichtlineares Verhalten. Die konkave Form der Kurve ist weitgehend vom pH unabhängig. Vergleicht man den Wertebereich mit dem des daneben abgebildeten Arginins, wird die geringe Druckabhängigkeit der Glutaminsäure deutlich. Die unterschiedliche Neigung sollte wegen des kleinen Variationsbereichs der Werte und des Temperaturmessfehlers nicht überbewertet werden. Obwohl das Auftreten eines hohen Messfehlers bei linearer Näherung (Gl.4.2) zu 83 % mit dem Absolutbetrag des quadratischen Druckkoeffizienten aus der Näherung mit einem Polynom zweiter Ordnung nach Gl.4.3. korreliert ist, sind die Abweichungen von der Linearität eher gering, wie die Auftragung der linearen Druckkoeffizienten in Abb.4.10. beweist.

Im Gegensatz zu Glu3 verhält sich Arginin im pH-Bereich 5,0 bis 5,4 nahezu vollkommen linear, die erhebliche Nichtlinearität der Arg3 Druckkurve bei pH 7,0 ist durch die geringe Signalqualität in diesem Bereich unter Beachtung des zugehörigen Spektrums (Abb.4.8.) rechts leicht zu begründen.

Glu3	Phosphat pH 5,0	Phosphat pH 5,4	Phosphat pH 7,0	Tris/HCl pH 7,0	Arg3	Phosphat pH 5,4	Phosphat pH 7,0	Tris/HCl pH 7,0
p[GPa]	$\delta^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta^{\text{HN}}$ [ppm]		$\delta^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta^{\text{HN}}$ [ppm]
0,00	8,4854	8,5215	8,5274	8,5552		8,3704	8,3759	8,3054
0,05	8,4819	8,5153	8,5244	8,5453		8,3886	8,3941	8,3227
0,10	8,4827	8,5140	8,5244	8,5427		8,4064	8,4104	8,3476
0,15	8,4860	8,5132	8,5286	8,5420		8,4230	8,4270	8,3597
0,20	8,4909	8,5160	8,5317	8,5449		8,4397	8,4440	8,3997

Tab.4.7. Messdaten der chemischen Verschiebung der  $\text{H}^{\text{N}}$ -Protonen des Residuums X3 der Tetrapeptide GGXA bei fünf verschiedenen Druckstufen und unterschiedlichen Pufferbedingungen. Gly-Gly-Glu-Ala zeigt nichtlineares Verhalten, Gly-Gly-Arg-Ala dagegen weitgehend lineares Verhalten.

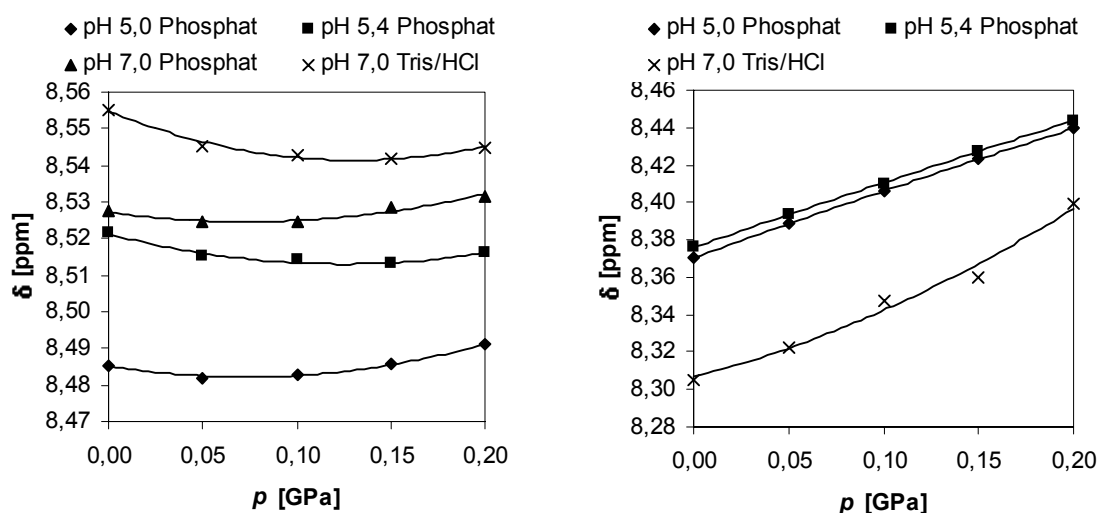


Abb.4.9. Links sind die Resonanzen der  $H^N$ -Linie der Glu3 abgebildet, rechts die  $H^N$ -Linie von Arg3. Das Druckverhalten bei Glu3 ist bei allen vermessenen pH und Pufferbedingungen im gleichen Maß nichtlinear. Arg3 verhält sich dagegen bei hohem pH streng linear, die Nichtlinearität bei pH 7,0 ist durch hohe Ungenauigkeit der Bestimmung der Signalposition aufgrund starker Austauschverbreiterung bedingt.

Die Temperaturabhängigkeit des Modellsystems GGXA wurde bisher nicht vermessen, für das vergleichbare System GGXGG ist sie jedoch im Bereich 278-328 K bekannt (Merutka et al. 1994). Die linearen Temperaturkoeffizienten korrelieren zu  $-70\%$  (pH 5,4) zu den konstanten Koeffizienten der Druckverschiebungen, diese entsprechen den schon bekannten Daten von Bundi und Wüthrich (1979b). Auf einen ähnlichen Wert von  $-67\%$  kommt man durch Korrelation der linearen Druckkoeffizienten mit den konstanten Koeffizienten. Für ungefaltete Proteine wird eine hohe Druckabhängigkeit mit der Existenz von Wasserstoffbrücken vom Amidproton zum Wasser verbunden (Li et al. 1998). Das gleiche gilt für die Temperaturabhängigkeiten, eine Brückenbindung zum Wasser äußert sich in hohen linearen Koeffizienten (Young et al. 1994). Sind die Ursachen für die Höhe der Druck- und Temperaturabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen ähnlich, muss sich zwangsläufig eine Korrelation von vergleichbarer Höhe ergeben.

Vergleicht man lineare Druck- und Temperaturkoeffizienten direkt, so wird die Unterschiedlichkeit der Vorgänge auf molekularer Ebene durch die geringere Korrelation von  $40\%$  deutlich. Alle Interpretationen dazu wären jedoch reine Spekulation, da keine theoretischen Ansätze zur Beschreibung der vielfältigen Einflüsse auf das Verhalten der Amidprotonen gegeben sind.

In Anbetracht der wesentlich besseren Signalqualität bei niedrigem pH sind Aussagen über druckinduzierte Änderungen der chemischen Verschiebung von austauschenden Protonen nur im Bereich von  $pH \leq 5,4$  legitim und unter Berücksichtigung der obigen Betrachtungen über die Puffersysteme für alle Kombinationen der Peptide GGXA mit Ausnahme von Histidin auch auf die natürlichen pH Bedingungen der Zelle übertragbar.

Zur allgemeinen Übersicht vor der weiteren Diskussion der Ergebnisse zeigt Abb.4.11. die Stärke des linearen Druckkoeffizienten der Protonen in den Strukturformeln aller 20 vermessenen Tetrapeptide GGXA bei pH 5,4 in Phosphatpuffer. Der Durchmesser der Kreise um die Protonen symbolisiert die Stärke, die Farbe Vorzeichen und Größenordnung des linearen Druckkoeffizienten. Soweit stereospezifische Zuordnungen möglich waren, entsprechen diese den IUPAC Konventionen der Veröffentlichung von Markley et al. (1998).

Im Anschluss folgen die Tabellen der Koeffizienten von linearem und quadratischem Term aus Gl.4.3. zu Beschreibung der chemischen Verschiebungen. Tab.4.8. bis 4.16..

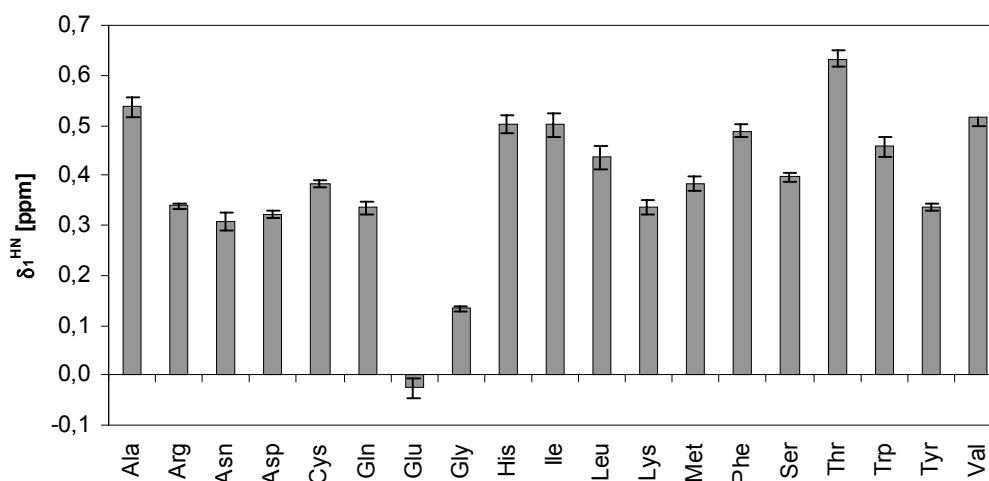


Abb.4.10. Die linearen Druckkoeffizienten  $\delta_1$  der  $H^N$ -Protonen in den Peptiden GGXA. Der geringe Fehler belegt die hohe Linearität im gemessenen Druckbereich. Der Wert von Glutamat liegt hier um Null, hat aber einen sehr hohen quadratischen Koeffizienten  $\delta_2$ , der in Abb.4.12. gezeigt wird.

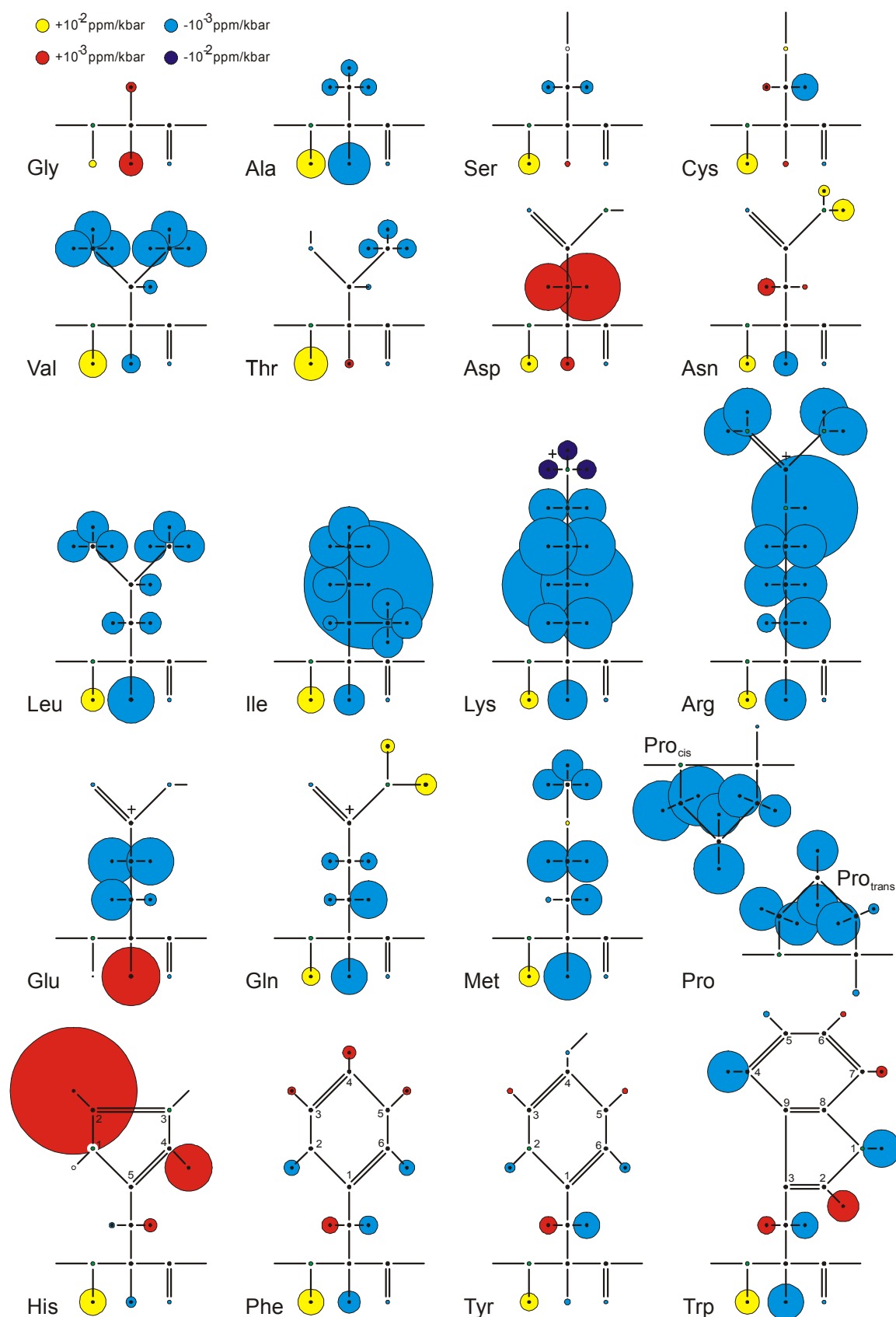


Abb.4.11. Die  $^1\text{H}$ -Druckkoeffizienten aller 20 Aminosäuren X3 in den Tetrapeptiden GGXA. Der Kreisdurchmesser symbolisiert die Stärke, die Farbe Vorzeichen und Größenordnung der druckinduzierten Änderungen der chemischen Verschiebung.

X3	Phosphatpuffer pH 5,0		Phosphatpuffer pH 5,4		Tris/HCl Puffer pH 7,0	
	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]
Ala	8,285	0,515 ± 0,010	8,283	0,537 ± 0,020	<sup>a</sup> 8,293	0,424 ± 0,039
Arg	8,371	0,346 ± 0,004	8,376	0,338 ± 0,004	8,302	8,302 ± 0,048
Asn	8,491	0,357 ± 0,012	8,503	0,307 ± 0,019		
Asp	8,428	0,357 ± 0,007	8,418	0,323 ± 0,007	8,384	0,257 ± 0,005
Cys	8,401	0,380 ± 0,011	8,409	0,383 ± 0,008	8,386	0,340 ± 0,029
Gln	8,432	0,340 ± 0,014	8,440	0,335 ± 0,013		
Glu	8,482	0,030 ± 0,019	8,522	-0,026 ± 0,019	8,551	-0,048 ± 0,027
Gly	8,395	0,147 ± 0,003	8,403	0,133 ± 0,005	8,377	0,199 ± 0,012
His	8,363	0,505 ± 0,016	8,367	0,502 ± 0,018		
Ile	8,192	0,504 ± 0,010	8,204	0,501 ± 0,024	8,184	0,509 ± 0,015
Leu	8,306	0,434 ± 0,012	8,319	0,436 ± 0,023		
Lys	8,384	0,357 ± 0,012	8,403	0,337 ± 0,015		
Met	8,418	0,408 ± 0,012	8,428	0,383 ± 0,016		
Phe	<sup>a</sup> 8,303	0,465 ± 0,030	<sup>a</sup> 8,301	0,489 ± 0,014	<sup>a</sup> 8,290	0,518 ± 0,011
Ser	8,341	0,468 ± 0,010	8,356	0,396 ± 0,008	8,329	0,627 ± 0,028
Thr	8,243	0,616 ± 0,011	8,251	0,633 ± 0,017	8,228	0,736 ± 0,012
Trp	8,190	0,475 ± 0,026	8,181	0,457 ± 0,021		
Tyr	8,195	0,333 ± 0,006	8,194	0,336 ± 0,007	8,136	0,319 ± 0,031
Val	8,187	0,517 ± 0,011	8,191	0,517 ± 0,018	8,171	0,523 ± 0,041

Tab.4.8. Lineare Druckkoeffizienten der H<sup>N</sup>-Protonen in der Peptidbindung an Position X3 im Bereich 0-0,2 GPa, (T = 305 K), Fehlende Werte sind wegen Austauschverbreiterung nicht sichtbar, mit <sup>a</sup> gekennzeichnete Werte sind vom H<sup>N</sup> Ala4 Signal überlagert.

X3	Phosphatpuffer pH 5,0			Phosphatpuffer pH 5,4			Tris/HCl Puffer pH 7,0		
	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppmGPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_2^{\text{HN}}$ [ppmGPa <sup>-2</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppmGPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_2^{\text{HN}}$ [ppmGPa <sup>-2</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppmGPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_2^{\text{HN}}$ [ppmGPa <sup>-2</sup> ]
Ala	8,284	0,56	-0,23	8,281	0,63	-0,44	<sup>a</sup> 8,288	0,64	-1,08
Arg	8,370	0,37	-0,12	8,376	0,35	-0,06	8,307	0,27	0,93
Asn	8,490	0,40	-0,22	8,504	0,26	0,34			
Asp	8,429	0,32	0,18	8,419	0,29	0,18	8,384	0,23	0,11
Cys	8,401	0,41	-0,15	8,409	0,38	0,00	8,386	0,33	0,06
Gln	8,432	0,37	-0,12	8,440	0,33	0,05			
Glu	8,485	-0,08	0,55	8,521	-0,13	0,53	8,555	-0,21	0,79
Gly	8,396	0,14	0,05	8,403	0,12	0,05	8,378	0,15	0,26
His	8,360	0,60	-0,46	8,364	0,60	-0,51			
Ile	8,191	0,56	-0,27	8,200	0,63	-0,66	8,183	0,57	-0,33
Leu	8,305	0,48	-0,24	8,317	0,53	-0,47			
Lys	8,382	0,41	-0,27	8,403	0,36	-0,25			
Met	8,417	0,45	-0,22	8,426	0,45	-0,34			
Phe	<sup>a</sup> 8,301	0,56	-0,48	<sup>a</sup> 8,301	0,47	0,10	<sup>a</sup> 8,289	0,56	-0,27
Ser	8,340	0,50	-0,15	8,352	0,48	-0,34	8,330	0,64	-0,78
Thr	8,242	0,68	-0,30	8,249	0,72	-0,44	8,228	0,74	-0,03
Trp	8,186	0,62	-0,73	8,178	0,57	-0,57			
Tyr	8,195	0,37	-0,16	8,193	0,38	-0,20	8,133	0,45	-0,64
Val	8,185	0,58	-0,30	8,189	0,61	-0,45	8,166	0,72	-1,00

Tab.4.9. Koeffizienten der quadratischen Fits der Druckmessreihen von H<sup>N</sup>-Protonen in der Peptidbindung an Position X3 im Bereich 0-0,2 GPa, (T = 305 K). Fehlende Werte sind wegen Austauschverbreiterung nicht sichtbar. Mit <sup>a</sup> gekennzeichnete Werte sind von der Ala4 Linie überlagert.

X3	Phosphat pH 5,0		Phosphat pH 5,4		Tris/HCl pH 7,0	
	$\delta_0^{\text{H}\alpha}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{H}\alpha}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{H}\alpha}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{H}\alpha}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{H}\alpha}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{H}\alpha}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]
Ala	4,324	-0,062 ± 0,008	4,326	-0,080 ± 0,015	4,325	-0,058 ± 0,004
Arg	4,361	-0,081 ± 0,003	4,361	-0,077 ± 0,003	4,362	-0,073 ± 0,006
Asn	<sup>a</sup> 4,720	-0,055 ± 0,004	<sup>a</sup> 4,720	-0,046 ± 0,003		±
Asp	<sup>a</sup> 4,663	0,020 ± 0,006	<sup>a</sup> 4,634	0,026 ± 0,007	4,602	-0,017 ± 0,010
Cys	4,565	0,012 ± 0,009	4,565	0,010 ± 0,010		±
Gln	4,350	-0,052 ± 0,005	4,349	-0,068 ± 0,004	4,366	-0,054 ± 0,002
Glu	4,321	0,092 ± 0,008	4,293	0,110 ± 0,004	4,310	0,044 ± 0,009
Gly	4,044	0,038 ± 0,003	4,044	0,045 ± 0,007	4,041	0,050 ± 0,003
His	<sup>a</sup> 4,713	-0,024 ± 0,003	<sup>a</sup> 4,713	-0,020 ± 0,004	4,645	-0,026 ± 0,009
Ile	4,191	-0,059 ± 0,003	4,189	-0,058 ± 0,010	4,192	-0,065 ± 0,006
Leu	4,343	-0,054 ± 0,004	4,345	-0,088 ± 0,004	4,348	-0,109 ± 0,004
Lys	4,303	-0,085 ± 0,008	4,301	-0,075 ± 0,015		±
Met	4,477	-0,079 ± 0,003	4,479	-0,089 ± 0,003	4,481	-0,086 ± 0,005
Phe	4,614	-0,042 ± 0,004	4,614	-0,042 ± 0,003	4,612	-0,054 ± 0,001
Pro <sup>cis</sup>	<sup>a</sup> 4,568	0,023 ± 0,004	<sup>a</sup> 4,568	0,024 ± 0,004	<sup>a</sup> 4,565	0,027 ± 0,004
Pro <sup>trans</sup>	<sup>a</sup> 4,416	0,008 ± 0,003	<sup>a</sup> 4,416	0,007 ± 0,004	<sup>a</sup> 4,420	-0,011 ± 0,002
Ser	4,496	0,000 ± 0,006	<sup>a</sup> 4,495	0,010 ± 0,003	4,494	0,013 ± 0,003
Thr	4,357	0,002 ± 0,001	4,353	0,016 ± 0,004	4,360	0,002 ± 0,003
Trp	<sup>a</sup> 4,652	-0,068 ± 0,005	<sup>a</sup> 4,652	-0,068 ± 0,003		±
Tyr	4,589	-0,008 ± 0,005	4,590	-0,011 ± 0,008		±
Val	4,147	-0,029 ± 0,003	4,146	-0,035 ± 0,004	4,150	-0,029 ± 0,007

Tab.4.10. Lineare Druckkoeffizienten der H<sup>α</sup>-Protonen an Position X3 für den Druckbereich 0-0,2 GPa bei 305 K. Mit <sup>a</sup> gekennzeichnete Signale wurden in 99 % D<sub>2</sub>O vermessen, da die Signale vom Wasser überlagert werden.

Ala4 X3	Phosphat pH 5,0		Phosphat pH 5,4		Tris/HCl pH 7,0	
	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]
Ala	8,355	0,386 ± 0,018	8,365	0,383 ± 0,014	8,293	0,424 ± 0,039
Arg	8,075	0,800 ± 0,024	8,069	0,796 ± 0,024	8,028	0,763 ± 0,021
Asn	8,345	0,482 ± 0,019	8,349	0,485 ± 0,010	8,339	0,404 ± 0,048
Asp	7,937	0,821 ± 0,021	7,919	0,798 ± 0,021	7,871	0,767 ± 0,019
Cys	8,062	0,787 ± 0,023	8,070	0,781 ± 0,019	8,050	0,733 ± 0,017
Gln	8,388	0,500 ± 0,016	8,388	0,498 ± 0,020	8,395	0,372 ± 0,043
Glu	8,016	0,840 ± 0,026	7,980	0,854 ± 0,029	7,962	0,822 ± 0,023
Gly	7,849	0,788 ± 0,023	7,848	0,769 ± 0,026	7,842	0,763 ± 0,014
His	8,263	0,518 ± 0,014	8,248	0,550 ± 0,022	7,970	-0,096 ± 0,002
Ile	8,372	0,566 ± 0,018	8,383	0,564 ± 0,030	8,374	0,599 ± 0,011
Leu	8,296	0,551 ± 0,017	8,300	0,587 ± 0,021	8,301	0,522 ± 0,041
Lys	8,355	0,525 ± 0,036	8,364	0,509 ± 0,019	8,352	0,404 ± 0,061
Met	8,350	0,525 ± 0,023	8,351	0,533 ± 0,027	8,353	0,536 ± 0,022
Phe	<sup>a</sup> 8,303	0,465 ± 0,030	<sup>a</sup> 8,301	0,489 ± 0,014	<sup>a</sup> 8,290	0,518 ± 0,011
Pro	8,065	0,888 ± 0,031	8,062	0,889 ± 0,028	7,935	0,936 ± 0,031
Ser	8,018	0,729 ± 0,032	8,013	0,706 ± 0,022	8,010	0,714 ± 0,024
Thr	8,370	0,489 ± 0,013	8,373	0,522 ± 0,016	8,111	0,482 ± 0,033
Trp	8,105	0,506 ± 0,018	8,097	0,534 ± 0,027	7,834	0,835 ± 0,019
Tyr	7,883	0,883 ± 0,020	7,876	0,868 ± 0,023	8,392	0,526 ± 0,030
Val	8,392	0,542 ± 0,013	8,394	0,553 ± 0,020	8,350	0,644 ± 0,038

Tab.4.11. Lineare H<sup>N</sup>-Druckkoeffizienten des C-terminalen Alanins. (0-0,2 GPa, 305 K)  
Mit <sup>a</sup> gekennzeichnete Werte sind der X3 Linie überlagert.



Phosphatpuffer pH 5,0						
X3	Atom	$\delta_0$ [ppm]	$\delta_1$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	Atom	$\delta_0$ [ppm]	$\delta_1$ [ppm/GPa]
Ala	H <sup><math>\beta</math></sup>	1,399	-0,031 $\pm$ 0,006			
Arg	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	1,884	-0,098 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	1,655	-0,085 $\pm$ 0,003
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	1,772	-0,039 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\delta^2/\delta^3</math></sup>	3,210	-0,081 $\pm$ 0,003
				H <sup><math>\epsilon</math></sup>	7,223	-0,181 $\pm$ 0,015
				H <sup><math>\eta^{11/\eta^{12}/\eta^{21}/\eta^{22}}</math></sup>	6,673	-1,240 $\pm$ 0,498
Asn	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,840	0,015 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\delta^{21}</math></sup>	7,568	0,231 $\pm$ 0,012
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,753	0,039 $\pm$ 0,006	H <sup><math>\delta^{22}</math></sup>	6,966	0,402 $\pm$ 0,011
Asp	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,747	0,160 $\pm$ 0,004			
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,612	0,140 $\pm$ 0,005			
Cys	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,978	-0,047 $\pm$ 0,007			
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,925	0,024 $\pm$ 0,009			
Gln	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,123	-0,065 $\pm$ 0,007	H <sup><math>\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	2,380	-0,031 $\pm$ 0,005
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	1,999	-0,019 $\pm$ 0,011	H <sup><math>\epsilon^{21}</math></sup>	7,531	0,277 $\pm$ 0,006
				H <sup><math>\epsilon^{22}</math></sup>	6,930	0,378 $\pm$ 0,015
Glu	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,101	-0,025 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	2,352	0,086 $\pm$ 0,004
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	1,957	-0,038 $\pm$ 0,005			
His	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	3,283	-0,030 $\pm$ 0,002	H <sup><math>\delta^2</math></sup>	7,316	0,068 $\pm$ 0,009
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	3,212	-0,004 $\pm$ 0,001	H <sup><math>\epsilon</math></sup>	8,555	0,202 $\pm$ 0,017
Ile	H <sup><math>\beta</math></sup>	1,873	-0,012 $\pm$ 0,010	H <sup><math>\gamma^{12}</math></sup>	1,456	-0,154 $\pm$ 0,016
				H <sup><math>\gamma^{13}</math></sup>	1,192	-0,082 $\pm$ 0,017
				(H <sup><math>\gamma^2</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,924	-0,061 $\pm$ 0,004
				(H <sup><math>\delta^1</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,870	-0,079 $\pm$ 0,006
Leu	H <sup><math>\gamma/\beta^2/\beta^3</math></sup>	1,621	-0,014 $\pm$ 0,015	H <sup><math>\gamma/\beta^2/\beta^3</math></sup>	1,621	-0,014 $\pm$ 0,015
				(H <sup><math>\delta^1</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,931	-0,062 $\pm$ 0,004
				(H <sup><math>\delta^2</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,887	-0,055 $\pm$ 0,003
Lys	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	1,840	-0,085 $\pm$ 0,013	H <sup><math>\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	1,442	-0,126 $\pm$ 0,045
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	1,766	-0,051 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\delta^2/\delta^3</math></sup>	1,687	-0,103 $\pm$ 0,000
				H <sup><math>\epsilon^{2/\epsilon^3}</math></sup>	3,005	-0,073 $\pm$ 0,003
				(H <sup><math>\xi</math></sup> ) <sub>3</sub>	7,255	0,381 $\pm$ 0,028
Met	(H <sup><math>\epsilon</math></sup> ) <sub>3</sub> H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,109	-0,062 $\pm$ 0,006	(H <sup><math>\epsilon</math></sup> ) <sub>3</sub> H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,109	-0,062 $\pm$ 0,006
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,010	-0,006 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	2,592	-0,079 $\pm$ 0,019
Phe	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	3,119	-0,032 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\delta^{1/\delta^2}</math></sup>	7,286	-0,024 $\pm$ 0,004
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	3,055	0,029 $\pm$ 0,009	H <sup><math>\epsilon^{1/\epsilon^2}</math></sup>	7,385	0,012 $\pm$ 0,004
				H <sup><math>\xi</math></sup>	7,327	0,024 $\pm$ 0,004
Pro <sub>cis</sub>	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,267	-0,028 $\pm$ 0,001	H <sup><math>\gamma^3</math></sup>	1,907	-0,102 $\pm$ 0,001
	H <sup><math>\beta^3/\gamma^2</math></sup>	2,187	-0,093 $\pm$ 0,002	H <sup><math>\beta^3/\gamma^2</math></sup>	2,187	-0,093 $\pm$ 0,002
				H <sup><math>\delta^2/\delta^3</math></sup>	3,592	-0,068 $\pm$ 0,001
Pro <sub>trans</sub>	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,267	-0,031 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\delta^2/\delta^3</math></sup>	3,632	-0,084 $\pm$ 0,009
	H <sup><math>\beta^3/\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	2,016	-0,092 $\pm$ 0,007	H <sup><math>\beta^3/\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	2,016	-0,092 $\pm$ 0,007
Ser	H <sup><math>\beta^2/\beta^3</math></sup>	3,874	-0,022 $\pm$ 0,005			
Thr	H <sup><math>\beta</math></sup>	4,242	-0,011 $\pm$ 0,005	(H <sup><math>\gamma^2</math></sup> ) <sub>3</sub>	1,213	-0,039 $\pm$ 0,002
Trp	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	3,281	-0,049 $\pm$ 0,006	H <sup><math>\delta^1</math></sup>	7,271	0,052 $\pm$ 0,003
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	3,269	0,021 $\pm$ 0,008	H <sup><math>\epsilon^1</math></sup>	10,141	-0,065 $\pm$ 0,022
				H <sup><math>\epsilon^3</math></sup>	7,656	-0,085 $\pm$ 0,004
				H <sup><math>\zeta^2</math></sup>	7,180	-0,015 $\pm$ 0,004
				H <sup><math>\zeta^3</math></sup>	7,515	0,016 $\pm$ 0,005
				H <sup><math>\eta^2</math></sup>	7,251	-0,005 $\pm$ 0,005
Tyr	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	3,119	-0,053 $\pm$ 0,004	H <sup><math>\delta^{1/\delta^2}</math></sup>	7,146	-0,017 $\pm$ 0,004
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,904	0,037 $\pm$ 0,003	H <sup><math>\epsilon^{1/\epsilon^2}</math></sup>	6,848	0,005 $\pm$ 0,003
Val	H <sup><math>\beta</math></sup>	2,099	-0,021 $\pm$ 0,004	(H <sup><math>\gamma^1</math></sup> ) <sub>3</sub> (H <sup><math>\gamma^2</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,942	-0,061 $\pm$ 0,006

Tab.4.12. Druckabhängigkeiten der Seitenketten Protonen in Phosphatpuffer bei pH 5,0.

Phosphatpuffer pH 5,4						
X3	Atom	$\delta_0$ [ppm]	$\delta_1$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	Atom	$\delta_0$ [ppm]	$\delta_1$ [ppm/GPa]
Ala	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	1,400	-0,031 $\pm$ 0,008			
Arg	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	1,885	-0,097 $\pm$ 0,006	H <sup><math>\gamma^{2/\gamma^3}</math></sup>	1,661	-0,083 $\pm$ 0,004
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	1,773	-0,035 $\pm$ 0,006	H <sup><math>\delta^{2/\delta^3}</math></sup>	3,211	-0,082 $\pm$ 0,003
				H <sup><math>\epsilon</math></sup>	7,236	-0,204 $\pm$ 0,014
				H <sup><math>\eta^{11/\eta^{12}/\eta^{21}/\eta^{22}}</math></sup>	6,680	-0,090 $\pm$ 0,043
Asn	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,842	0,009 $\pm$ 0,006	H <sup><math>\delta^{21}</math></sup>	7,573	0,214 $\pm$ 0,009
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,755	0,032 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\delta^{22}</math></sup>	6,966	0,417 $\pm$ 0,008
Asp	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,729	0,128 $\pm$ 0,004			
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,592	0,089 $\pm$ 0,004			
Cys	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,977	-0,050 $\pm$ 0,005			
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,926	0,014 $\pm$ 0,007			
Gln	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,124	-0,071 $\pm$ 0,006	H <sup><math>\gamma^{2/\gamma^3}</math></sup>	2,380	-0,032 $\pm$ 0,001
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,000	-0,023 $\pm$ 0,004	H <sup><math>\epsilon^{21}</math></sup>	7,532	0,260 $\pm$ 0,007
				H <sup><math>\epsilon^{22}</math></sup>	6,929	0,395 $\pm$ 0,008
Glu	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,086	-0,023 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\gamma^{2/\gamma^3}</math></sup>	2,301	0,089 $\pm$ 0,012
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	1,949	-0,077 $\pm$ 0,008			
His	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	3,284	-0,025 $\pm$ 0,002	H <sup><math>\delta^2</math></sup>	7,311	0,089 $\pm$ 0,009
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	3,210	0,006 $\pm$ 0,003	H <sup><math>\epsilon</math></sup>	8,546	0,243 $\pm$ 0,021
Ile	H <sup><math>\beta</math></sup>	1,872	0,027 $\pm$ 0,018	H <sup><math>\gamma^{12}</math></sup>	1,458	-0,243 $\pm$ 0,024
				H <sup><math>\gamma^{13}</math></sup>	1,190	-0,065 $\pm$ 0,019
				(H <sup><math>\gamma^2</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,923	-0,058 $\pm$ 0,003
				(H <sup><math>\delta^1</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,870	-0,078 $\pm$ 0,005
Leu	H <sup><math>\gamma/\beta^{2/\beta^3}</math></sup>	1,624	-0,041 $\pm$ 0,017	H <sup><math>\gamma/\beta^{2/\beta^3}</math></sup>	1,626	-0,041 $\pm$ 0,017
				(H <sup><math>\delta^1</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,931	-0,060 $\pm$ 0,005
				(H <sup><math>\delta^2</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,888	-0,061 $\pm$ 0,004
Lys	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	1,845	-0,096 $\pm$ 0,011	H <sup><math>\gamma^{2/\gamma^3}</math></sup>	1,437	-0,174 $\pm$ 0,029
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	1,772	-0,075 $\pm$ 0,011	H <sup><math>\delta^{2/\delta^3}</math></sup>	1,688	-0,109 $\pm$ 0,029
				H <sup><math>\epsilon^{2/\epsilon^3}</math></sup>	3,004	-0,073 $\pm$ 0,029
				(H <sup><math>\epsilon</math></sup> ) <sub>3</sub>	7,260	0,368 $\pm$ 0,016
Met	(H <sup><math>\epsilon</math></sup> ) <sub>3</sub> H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,109	-0,058 $\pm$ 0,003	(H <sup><math>\epsilon</math></sup> ) <sub>3</sub> H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,109	-0,058 $\pm$ 0,003
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,013	-0,007 $\pm$ 0,004	H <sup><math>\gamma^{2/\gamma^3}</math></sup>	2,590	-0,079 $\pm$ 0,004
Phe	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	3,121	-0,035 $\pm$ 0,006	H <sup><math>\delta^{1/\delta^2}</math></sup>	7,287	-0,029 $\pm$ 0,005
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	3,056	0,031 $\pm$ 0,002	H <sup><math>\epsilon^{1/\epsilon^2}</math></sup>	7,386	0,015 $\pm$ 0,003
				H <sup><math>\epsilon</math></sup>	7,328	0,025 $\pm$ 0,005
Pro <sub>cis</sub>	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,384	-0,060 $\pm$ 0,009	H <sup><math>\gamma^3</math></sup>	1,906	-0,095 $\pm$ 0,008
	H <sup><math>\beta^3/\gamma^2</math></sup>	2,188	-0,081 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\beta^3/\gamma^2</math></sup>	2,188	-0,081 $\pm$ 0,005
				H <sup><math>\delta^{2/\delta^3}</math></sup>	3,558	-0,113 $\pm$ 0,007
Pro <sub>trans</sub>	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,266	-0,020 $\pm$ 0,008	H <sup><math>\delta^{2/\delta^3}</math></sup>	3,632	-0,077 $\pm$ 0,005
	H <sup><math>\beta^3/\gamma^{2/\gamma^3}</math></sup>	2,015	-0,082 $\pm$ 0,004	H <sup><math>\beta^3/\gamma^{2/\gamma^3}</math></sup>	2,015	-0,082 $\pm$ 0,004
Ser	H <sup><math>\beta^{2/\beta^3}</math></sup>	3,874	-0,024 $\pm$ 0,003			
Thr	H <sup><math>\beta</math></sup>	4,241	-0,003 $\pm$ 0,005	(H <sup><math>\gamma^2</math></sup> ) <sub>3</sub>	1,213	-0,036 $\pm$ 0,003
Trp	H <sup><math>\beta^2</math></sup> H <sup><math>\beta^3</math></sup>	3,281 3,268	-0,047 $\pm$ 0,009 0,026 $\pm$ 0,004	H <sup><math>\delta^1</math></sup>	7,271	0,059 $\pm$ 0,009
				H <sup><math>\epsilon^1</math></sup>	10,141	-0,071 $\pm$ 0,012
				H <sup><math>\epsilon^3</math></sup>	7,654	-0,078 $\pm$ 0,005
				H <sup><math>\zeta^2</math></sup>	7,179	-0,011 $\pm$ 0,004
				H <sup><math>\zeta^3</math></sup>	7,515	0,021 $\pm$ 0,000
				H <sup><math>\eta^2</math></sup>	7,251	-0,006 $\pm$ 0,005
Tyr	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	3,120	-0,050 $\pm$ 0,002	H <sup><math>\delta^{1/\delta^2}</math></sup>	7,146	-0,019 $\pm$ 0,002
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,915	0,033 $\pm$ 0,001	H <sup><math>\epsilon^{1/\epsilon^2}</math></sup>	6,849	0,000 $\pm$ 0,001
Val	H <sup><math>\beta</math></sup>	2,114	-0,026 $\pm$ 0,006	(H <sup><math>\gamma^1</math></sup> ) <sub>3</sub> (H <sup><math>\gamma^2</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,943	-0,068 $\pm$ 0,004

Tab.4.13. Druckabhängigkeiten der Seitenketten Protonen in Phosphatpuffer bei pH 5,4.

Tris/HCl Puffer pH 7,0						
X3	Atom	$\delta_0$ [ppm]	$\delta_1$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	Atom	$\delta_0$ [ppm]	$\delta_1$ [ppm/GPa]
Ala	H <sup><math>\beta</math></sup>	1,397	-0,027 $\pm$ 0,004			
Arg	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	1,877	-0,101 $\pm$ 0,006	H <sup><math>\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	1,653	-0,088 $\pm$ 0,005
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	1,752	-0,023 $\pm$ 0,007	H <sup><math>\delta^2/\delta^3</math></sup>	3,208	-0,079 $\pm$ 0,003
				H <sup><math>\epsilon</math></sup>	Linien durch Austausch nicht sichtbar !	
				H <sup><math>\eta^{11/\eta^{12}/\eta^{21}/\eta^{22}}</math></sup>		
Asn	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,839	0,014 $\pm$ 0,003	H <sup><math>\delta^{21}</math></sup>	7,556	0,206 $\pm$ 0,012
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,750	0,041 $\pm$ 0,004	H <sup><math>\delta^{22}</math></sup>	6,964	0,377 $\pm$ 0,021
Asp	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,716	0,094 $\pm$ 0,008			
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,581	0,030 $\pm$ 0,008			
Cys	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	3,003	0,012 $\pm$ 0,008			
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,927	0,006 $\pm$ 0,004			
Gln	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,121	-0,061 $\pm$ 0,003	H <sup><math>\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	2,378	-0,028 $\pm$ 0,004
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	1,997	-0,015 $\pm$ 0,002	H <sup><math>\epsilon^{21}</math></sup>	7,530	0,209 $\pm$ 0,007
				H <sup><math>\epsilon^{22}</math></sup>	6,923	0,414 $\pm$ 0,008
Glu	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,099	-0,051 $\pm$ 0,004	H <sup><math>\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	2,347	-0,009 $\pm$ 0,009
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	1,951	-0,067 $\pm$ 0,006			
His	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	3,171	-0,064 $\pm$ 0,004	H <sup><math>\delta^2</math></sup>	7,067	-0,046 $\pm$ 0,003
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	3,097	-0,057 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\epsilon</math></sup>	8,037	0,601 $\pm$ 0,012
Ile	H <sup><math>\beta</math></sup>	1,871	-0,007 $\pm$ 0,004	(H <sup><math>\delta^1</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,870	-0,082 $\pm$ 0,004
				H <sup><math>\gamma^{12}</math></sup>	1,460	-0,147 $\pm$ 0,003
				H <sup><math>\gamma^{13}</math></sup>	1,186	-0,051 $\pm$ 0,006
				(H <sup><math>\gamma^2</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,925	-0,068 $\pm$ 0,001
Leu	H <sup><math>\gamma/\beta^2/\beta^3</math></sup>	1,622	-0,038 $\pm$ 0,007	H <sup><math>\gamma/\beta^2/\beta^3</math></sup>	1,622	-0,038 $\pm$ 0,007
				(H <sup><math>\delta^1</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,930	-0,057 $\pm$ 0,004
				(H <sup><math>\delta^2</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,886	-0,050 $\pm$ 0,006
Lys	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	1,843	-0,081 $\pm$ 0,008	H <sup><math>\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	1,450	-0,122 $\pm$ 0,006
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	1,755	-0,029 $\pm$ 0,008	H <sup><math>\delta^2/\delta^3</math></sup>	1,682	-0,095 $\pm$ 0,005
				H <sup><math>\epsilon^{2/\epsilon^3}</math></sup>	3,001	-0,064 $\pm$ 0,005
				(H <sup><math>\epsilon</math></sup> ) <sub>3</sub>	7,260	0,385 $\pm$ 0,010
Met	(H <sup><math>\epsilon</math></sup> ) <sub>3</sub> H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,110	-0,055 $\pm$ 0,008	(H <sup><math>\epsilon</math></sup> ) <sub>3</sub> H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,110	-0,055 $\pm$ 0,008
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,000	-0,003 $\pm$ 0,002	H <sup><math>\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	2,589	-0,081 $\pm$ 0,004
Phe	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	3,122	-0,036 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\delta^1/\delta^2</math></sup>	7,284	-0,028 $\pm$ 0,004
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	3,050	0,032 $\pm$ 0,003	H <sup><math>\epsilon^{1/\epsilon^2}</math></sup>	7,384	0,008 $\pm$ 0,004
				H <sup><math>\epsilon</math></sup>	7,327	0,019 $\pm$ 0,004
Pro <sub>cis</sub>	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,267	-0,028 $\pm$ 0,004	H <sup><math>\gamma^3</math></sup>	1,907	-0,102 $\pm$ 0,006
	H <sup><math>\beta^3/\gamma^2</math></sup>	2,187	-0,093 $\pm$ 0,010	H <sup><math>\beta^3/\gamma^2</math></sup>	2,187	-0,093 $\pm$ 0,010
				H <sup><math>\delta^2/\delta^3</math></sup>	3,592	-0,068 $\pm$ 0,004
Pro <sub>trans</sub>	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	2,382	-0,059 $\pm$ 0,004	H <sup><math>\delta^2/\delta^3</math></sup>	3,633	-0,079 $\pm$ 0,003
	H <sup><math>\beta^3/\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	2,012	-0,079 $\pm$ 0,003	H <sup><math>\beta^3/\gamma^2/\gamma^3</math></sup>	2,012	-0,079 $\pm$ 0,003
Ser	H <sup><math>\beta^2/\beta^3</math></sup>	von H <sup><math>\alpha</math></sup> Gly 1 verdeckt !				
Thr	H <sup><math>\beta</math></sup>	4,242	-0,009 $\pm$ 0,003	(H <sup><math>\gamma^2</math></sup> ) <sub>3</sub>	1,211	-0,038 $\pm$ 0,002
Trp	H <sup><math>\beta^2</math></sup> H <sup><math>\beta^3</math></sup>	3,281	-0,056 $\pm$ 0,009	H <sup><math>\delta^1</math></sup>	7,262	0,065 $\pm$ 0,006
		3,267	0,024 $\pm$ 0,009	H <sup><math>\epsilon^1</math></sup>	10,128	-0,065 $\pm$ 0,018
				H <sup><math>\epsilon^3</math></sup>	7,656	-0,082 $\pm$ 0,006
				H <sup><math>\zeta^2</math></sup>	7,181	-0,016 $\pm$ 0,004
				H <sup><math>\zeta^3</math></sup>	7,513	0,024 $\pm$ 0,005
				H <sup><math>\eta^2</math></sup>	7,254	-0,021 $\pm$ 0,008
Tyr	H <sup><math>\beta^2</math></sup>	3,120	-0,047 $\pm$ 0,004	H <sup><math>\delta^1/\delta^2</math></sup>	7,145	-0,018 $\pm$ 0,005
	H <sup><math>\beta^3</math></sup>	2,904	0,027 $\pm$ 0,005	H <sup><math>\epsilon^{1/\epsilon^2}</math></sup>	6,846	0,001 $\pm$ 0,005
Val	H <sup><math>\beta</math></sup>	2,100	-0,025 $\pm$ 0,006	(H <sup><math>\gamma^1</math></sup> ) <sub>3</sub> (H <sup><math>\gamma^2</math></sup> ) <sub>3</sub>	0,942	-0,057 $\pm$ 0,004

Tab.4.14. Druckabhängigkeiten der Seitenketten Protonen in Tris/HCl-Puffer bei pH 7,0.

Ala4 X3	Phosphat pH 5,0		Phosphat pH 5,4		Tris/HCl pH 7,0	
	$\delta_0^{\text{H}\alpha}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{H}\alpha}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{H}\alpha}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{H}\alpha}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{H}\alpha}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{H}\alpha}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]
Ala	4,283	-0,061 ± 0,006	4,285	-0,076 ± 0,013	4,275	-0,062 ± 0,005
Arg	4,135	-0,115 ± 0,006	4,132	-0,121 ± 0,006	4,134	-0,128 ± 0,007
Asn	4,296	-0,044 ± 0,007	4,296	-0,055 ± 0,004	4,298	-0,047 ± 0,004
Asp	4,141	-0,054 ± 0,006	4,131	-0,076 ± 0,004	4,130	-0,092 ± 0,012
Cys	4,145	-0,098 ± 0,007	4,144	-0,106 ± 0,006	4,144	-0,117 ± 0,003
Gln	4,295	-0,065 ± 0,007	4,294	-0,065 ± 0,007	4,296	-0,064 ± 0,003
Glu	4,152	-0,092 ± 0,026	4,149	-0,104 ± 0,004	4,146	-0,130 ± 0,004
Gly	4,171	-0,098 ± 0,008	4,167	-0,103 ± 0,010	4,159	-0,102 ± 0,004
His	4,155	-0,097 ± 0,003	4,156	-0,087 ± 0,004	4,121	-0,068 ± 0,013
Ile	4,308	-0,090 ± 0,008	4,302	-0,065 ± 0,007	4,304	-0,083 ± 0,004
Leu	4,292	-0,089 ± 0,010	4,290	-0,075 ± 0,006	4,289	-0,072 ± 0,005
Lys	4,310	-0,075 ± 0,004	4,309	-0,079 ± 0,010	4,314	-0,073 ± 0,006
Met	4,302	-0,066 ± 0,004	4,301	-0,060 ± 0,006	4,302	-0,064 ± 0,005
Phe	4,245	-0,059 ± 0,004	4,246	-0,068 ± 0,007	4,249	-0,072 ± 0,005
Pro <sub>cis</sub>	4,128	-0,121 ± 0,012	4,123	-0,108 ± 0,006	4,126	-0,129 ± 0,002
Pro <sub>trans</sub>	4,174	0,007 ± 0,013	4,173	-0,004 ± 0,012	4,169	0,011 ± 0,006
Ser	4,163	-0,081 ± 0,008	4,160	-0,092 ± 0,005	4,157	-0,107 ± 0,007
Thr	4,324	-0,072 ± 0,006	4,322	-0,067 ± 0,004	4,325	-0,072 ± 0,006
Trp	4,176	-0,161 ± 0,008	4,175	-0,150 ± 0,006	4,181	-0,149 ± 0,007
Tyr	4,113	-0,062 ± 0,005	4,110	-0,077 ± 0,004	4,110	-0,083 ± 0,007
Val	4,302	-0,091 ± 0,007	4,302	-0,094 ± 0,005	4,301	-0,085 ± 0,003

Tab.4.15. Lineare H<sup>α</sup>-Druckkoeffizienten des C-terminalen Alanins.

Ala4 X3	Phosphat pH 5,0		Phosphat pH 5,4		Tris/HCl pH 7,0	
	$\delta_0^{\text{H}\beta}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{H}\beta}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{H}\beta}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{H}\beta}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{H}\beta}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{H}\beta}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]
Ala	1,393	-0,026 ± 0,006	1,392	-0,021 ± 0,005	1,390	-0,019 ± 0,004
Arg	1,336	-0,005 ± 0,002	1,335	-0,006 ± 0,004	1,331	-0,007 ± 0,004
Asn	1,403	-0,034 ± 0,003	1,404	-0,037 ± 0,006	1,401	-0,037 ± 0,004
Asp	1,337	0,009 ± 0,002	1,334	0,003 ± 0,002	1,329	-0,003 ± 0,007
Cys	1,343	-0,009 ± 0,004	1,343	-0,012 ± 0,004	1,341	-0,020 ± 0,003
Gln	1,401	-0,029 ± 0,008	1,401	-0,031 ± 0,002	1,399	-0,026 ± 0,003
Glu	1,338	-0,004 ± 0,002	1,335	-0,002 ± 0,005	1,339	-0,012 ± 0,005
Gly	1,336	-0,011 ± 0,005	1,335	-0,009 ± 0,005	1,334	-0,012 ± 0,001
His	1,355	-0,040 ± 0,002	1,355	-0,040 ± 0,003	1,324	-0,024 ± 0,003
Ile	1,394	-0,026 ± 0,006	1,393	-0,021 ± 0,004	1,393	-0,024 ± 0,003
Leu	1,393	-0,028 ± 0,004	1,395	-0,031 ± 0,002	1,392	-0,024 ± 0,005
Lys	1,398	-0,031 ± 0,005	1,398	-0,027 ± 0,004	1,397	-0,026 ± 0,004
Met	1,400	-0,024 ± 0,003	1,400	-0,022 ± 0,004	1,398	-0,019 ± 0,005
Phe	1,326	-0,039 ± 0,002	1,327	-0,041 ± 0,005	1,328	-0,044 ± 0,004
Pro <sub>cis</sub>	1,354	-0,036 ± 0,001	1,352	-0,026 ± 0,007	1,358	-0,024 ± 0,002
Pro <sub>trans</sub>	1,334	0,000 ± 0,003	1,332	0,003 ± 0,007	1,330	0,003 ± 0,001
Ser	1,343	-0,007 ± 0,005	1,342	-0,007 ± 0,005	1,340	-0,006 ± 0,005
Thr	1,409	-0,029 ± 0,005	1,409	-0,028 ± 0,004	1,406	-0,022 ± 0,002
Trp	1,218	-0,138 ± 0,006	1,216	-0,134 ± 0,003	1,223	-0,133 ± 0,004
Tyr	1,317	-0,011 ± 0,002	1,316	-0,016 ± 0,000	1,313	-0,013 ± 0,006
Val	1,396	-0,028 ± 0,004	1,396	-0,030 ± 0,003	1,395	-0,026 ± 0,004

Tab.4.16. Lineare H<sup>β</sup>-Druckkoeffizienten des C-terminalen Alanins.

#### 4.2.4. Lineare druckinduzierte Verschiebungen im Proteinerückgrat

Die chemischen Verschiebungen der  $H^N$ -Protonen geben im wesentlichen Auskunft über intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen (Li et al. 1998). Der mittlere lineare Druckkoeffizient liegt bei  $\langle \delta_1^{HN} \rangle = 0,38 \pm 0,20 \text{ ppm GPa}^{-1}$  und stimmt damit sowohl im Wert, als auch im Vorzeichen mit den aus der Literatur bekannten Druckdaten verschiedener Proteine überein. Tab.4.17. zeigt einige Daten im Vergleich mit den Random Coil Werten der Tetrapeptide, im Vorgriff auf die folgenden Kapitel sind bereits die Daten von *TmCsp* enthalten.

Protein	$\langle \delta_1^{HN} \rangle$ [ppm Gpa <sup>-1</sup> ]	Max. $\delta_1^{HN}$ [ppm Gpa <sup>-1</sup> ]	Min. $\delta_1^{HN}$ [ppm Gpa <sup>-1</sup> ]	T [K]	Referenz
<b>GGXA</b>	0,38	0,78	0,00	305	
<i>TmCsp (nativ)</i>	0,23	1,15	-1,18	276	
<i>TmCsp (nativ)</i>	0,26	1,34	-1,17	303	
<i>TmCsp (nativ)</i>	0,23	1,18	-1,20	330	
<i>Lysozym (nativ)</i>	0,35	3,00	-0,50	298	Kamatari et al. 2001
<b><i>Lysozym (denat.)</i></b>	0,40	0,90	-0,10	298	Kamatari et al. 2001
<i>BPTI (nativ)</i>	0,30	1,39	-0,11	309	Li et al. 1998, 1999
<b><i>BPTI (denat.)</i></b>	0,49	X	X	309	Li et al. 1998, 1999
Ubiquitin (nativ)	0,31	X	X	298	Kitahara et al. 2001
Melittin (nativ)	0,54	X	X	298	Akasaka et al. 2001
Protein G (nativ)	0,25	X	X	298	Li et al. 2000
Gurmarin (nativ)	0,28	1,05	-0,65	298	Inoue et al. 1998
HPr (nativ)	0,25	1,48	-1,08	313	Kalbitzer et al. 2000

Tab.4.17. Mittlere Druckkoeffizienten  $\langle \delta_1^{HN} \rangle$  verschiedener Proteine im Vergleich mit den Werten der Tetrapeptide. Hervorgehoben sind Bezeichnungen denaturierter Proteine und der Tetrapeptide. Bei gefalteten Proteinen ist die Streuung höher und es treten Werte im negativen Bereich auf. Mit X gekennzeichnete Daten sind in der Referenz nicht angegeben.

Analog zum geringeren Variationsbereich der chemischen Verschiebungen von Proteinen im ungefalteten Zustand, ist auch die Schwankungsbreite der Druckkoeffizienten des nicht gefalteten Modellsystems GGXA erheblich kleiner, als die in gefalteten Proteinen. Die Mittelwerte sind in den Tetrapeptiden wie in denaturierten Proteinen höher als in den gefalteten.

Die  $H^\alpha$ -Signale verschiebt die Druckanwendung zu höherem Feld hin. Quantitativ sind die Werte um eine Größenordnung kleiner, als die der Amidprotonen (Tab.4.18.).

Im Gegensatz zu den wenig über die Sekundärstruktur aussagenden chemischen Verschiebungen der  $H^N$ -Protonen, sind die  $H^\alpha$ -Protonen empfindliche Sensoren der Peptidstruktur (Wishart 1991, 1994). Da sich die chemischen Verschiebungen kaum ändern, kann auch davon ausgegangen werden, dass nur marginale Änderungen in der Struktur bei Anwendung von Druck bewirkt werden.

Protein	$\langle \delta_1^{H\alpha} \rangle$ [ppm Gpa <sup>-1</sup> ]	Max. $\delta_1^{H\alpha}$ [ppm Gpa <sup>-1</sup> ]	Min. $\delta_1^{H\alpha}$ [ppm Gpa <sup>-1</sup> ]	T [K]	Referenz
<i>GGXA</i>	-0,025	0,11	0,08	305	
<i>BPTI</i>	-0,07	0,26	-0,42	309	Li et al. 1999
Gurmarin	-0,12	0,10	-0,51	298	Inoue et al. 1998

Tab.4.18. Mittlere Druckkoeffizienten  $\langle \delta_{\Delta p}^{H\alpha} \rangle$  verschiedener Proteine im Vergleich mit den Random Coil Werten der Tetrapeptide.

#### 4.2.5. Druckabhängigkeiten in den Seitenketten

In den Seitenketten sind alle Druckkoeffizienten sehr klein, mit Ausnahme der Verschiebungen der N-gebundenen Protonen von Arg, Asn, Gln, His oder Lys. Die starken Verschiebungen sind möglicherweise auf die Einbindung in Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen.

Weiterhin auffallend sind die signifikant unterschiedlichen Druckkoeffizienten der stereospezifisch verschiedenen Amidprotonen von Asn und Gln. In beiden Fällen ist das pro-Z Proton stärker drucksensitiv (Tab.4.19.). Vergleichbare Daten aus Proteinen sind nur für *HPr* aus *S. carnosus* bekannt (Kalbitzer 2000). Hier wurden Seitenkettenatome stereospezifisch zugeordnet bei 298 K liegen die mittleren linearen Druckkoeffizienten mit 0,27 ppm GPa<sup>-1</sup> (pro-E) und 0,53 ppm GPa<sup>-1</sup> (pro-Z) in der Größenordnung wie die hier gemessenen Werte. Der Grund für das Verhalten ist nicht bekannt, jedoch offensichtlich nicht mit der spezifischen Proteinstruktur von *HPr* zu erklären.

Phosphatpuffer pH 5,4			
X3		$\delta_0$	$\delta_1$
		[ppm]	[ppm/GPa]
Asn	H <sup><math>\delta_{21}</math></sup>	7,573	0,214 $\pm$ 0,009
	H <sup><math>\delta_{22}</math></sup>	6,966	0,417 $\pm$ 0,008
Gln	H <sup><math>\epsilon_{21}</math></sup>	7,573	0,214 $\pm$ 0,009
	H <sup><math>\epsilon_{22}</math></sup>	6,966	0,417 $\pm$ 0,008

Tab.4.19. Die Druckkoeffizienten der stereospezifisch unterscheidbaren Amidprotonen von Asn und Gln sind jeweils für das pro-Z Proton stärker.

Die den Seitenkettenamidprotonen von Lys und Arg räumlich naheliegenden, aber fest gebundenen Protonen zeigen einen schwächeren Druckkoeffizienten, als die näher zum Proteinrückgrat gelegenen H <sup>$\beta$</sup> -Protonen (Abb.4.9.). Wie am Beispiel des Histidins bereits erwähnt, werden die druckinduzierten Änderungen intensiviert, wenn der pH der Lösung in der Nähe des pKa der ionisierbaren Seitengruppen liegt. Die pKa Werte der Aminosäuren Gln, Arg oder Lys liegen jedoch weit genug von den hier angewandten pH Werten entfernt, sodass diese Erklärung auszuschließen ist. Die Zunahme der Druckabhängigkeit der hydrophoben Anteile der Seitenketten zum Proteinrückgrat hin kann jedoch durch ein Eindringen der Hydrathülle um das Peptid in die für Wasser sterisch schlechter zugänglichen Bereiche gedeutet werden. Ein vergleichbarer Effekt ist gut an Isoleucin zu erkennen (Abb.4.11.).

#### 4.2.6. Nichtlineare Druckabhängigkeiten

In Proteinen werden häufig stark nichtlineare Druckabhängigkeiten beobachtet, die als Indikator für die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen verschiedenen Konformationen interpretiert werden. Da die Tetrapeptide zu kurz sind, um Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblätter auszubilden, kann es auch nicht zu Übergängen zwischen verschiedenen Konformationen kommen und damit auch nicht zu so starken Abweichungen in der Linearität des Druckkoeffizienten wie bei Proteinen. Wie schon aus Abb.4.12. bekannt, dominieren die linearen Druckabhängigkeiten weitgehend die nichtlinearen. Auf der Basis der Daten aus Tab.4.9. zeigt Abb.4.12. die Aminosäuren mit den stärksten nichtlinearen  $H^N$ -Druckkoeffizienten.

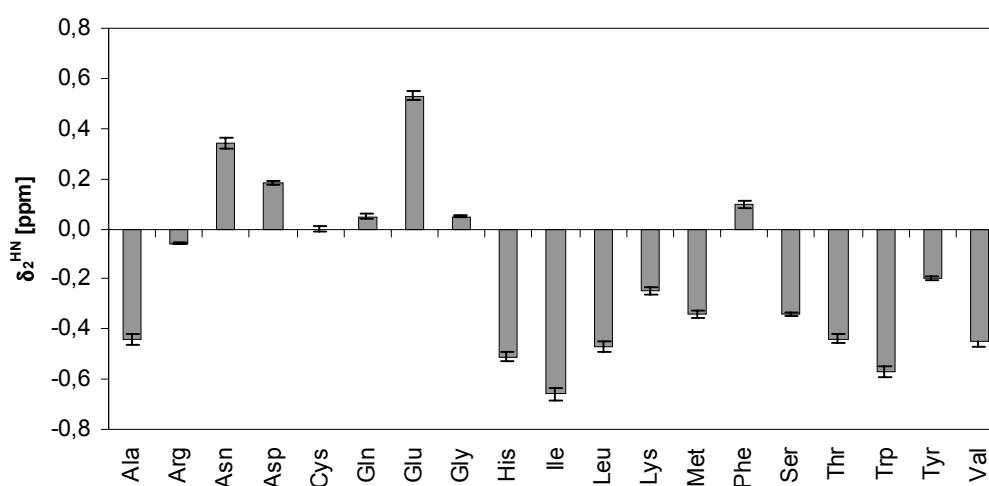


Abb.4.12. Die nichtlinearen  $H^N$ -Druckkoeffizienten  $\delta_2$  bei pH 5,4 in Phosphatpuffer. Besonders auffällig ist die hohe Nichtlinearität des Glutamats, dessen linearer Druckkoeffizient  $\delta_1$  nahezu verschwindet.

Wie aus den vorangegangenen Ausführungen zu entnehmen ist, liegt ausschließlich der  $pK_a$  von Histidin nah genug am hier verwendeten pH Messbereich, um als mögliche Erklärung für anormales Verhalten zu gelten. Histidin verhält sich hier jedoch nicht wesentlich verschieden von den anderen Aminosäuren, insbesondere sind die Nichtlinearitäten nicht auf Aminosäuren mit polaren Seitengruppen beschränkt. Allerdings kann das Verhalten auch nicht vom Messfehler herrühren, da die Größe des Fehlers bei linearer Näherung zu 83 % mit dem Absolutbetrag des quadratischen Druckkoeffizienten korreliert ist. Auch ein systematischer Fehler, verursacht z.B. durch ein nichtlineares Manometer zur Druckmessung, kann nicht die Erklärung sein, da die Krümmungen der Kurven beide Vorzeichen aufweisen.

Eine qualitative Analyse der chemischen Verschiebung (Bundi und Wüthrich 1979a) ergab für Glutamat die Ausbildung von Wasserstoffbrücken in einem dynamischen Gleichgewicht von der terminalen Carboxylgruppe zu den Amidprotonen von Gly2 (20 %) und Glu3 (50 %), was zu einer Abschirmung von Glu3 zu 70 % führt und damit den niedrigen Wert für den linearen Druckkoeffizienten des Glutamats erklärt.

Auch die Größe der quadratischen Druckkoeffizienten könnte durch Änderungen in der Konfiguration von Wasserstoffbrücken, die sehr empfindlich auf Applikation von Druck reagieren, erklärt werden. Für NH-OH Wasserstoffbrücken wurde dies bereits nachgewiesen (Li et al. 1998, Akasaka 2001), für CO-HO Bindungen sollte ähnliches gelten (persönliche Mitteilung K.Akasaka).

In die gleiche Richtung deutet auch die von Némethy (1972) beschriebene Möglichkeit zur Bildung von  $\gamma$ -Schleifen durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen den C=O und N-H Atomen verschiedener Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz hin (Abb.4.13).

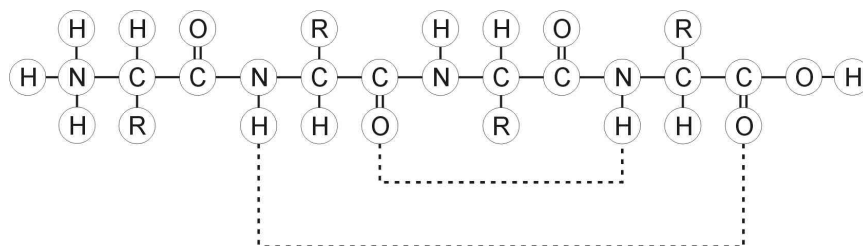


Abb.4.13. Das Modell von Némethy (1972) beschreibt die Ausbildung von  $\gamma$ -Schleifen in Peptidsequenzen durch Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien). Dieses Modell kann die nichtlineare Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des Glutamats in den Tetrapeptiden erklären.

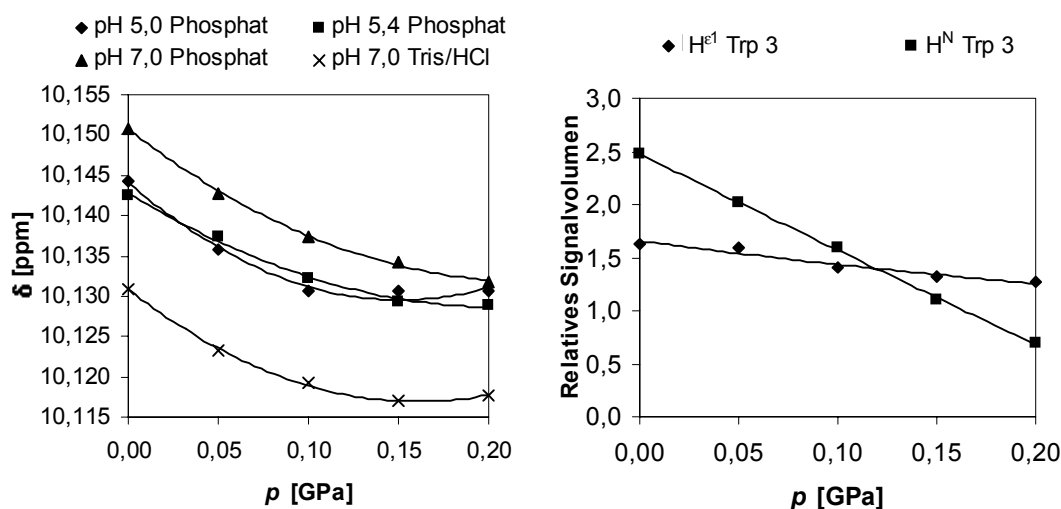


Abb.4.14. Links: nichtlineares Verhalten der chemischen Verschiebung der  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Linie des Tryptophans in Abhängigkeit des Drucks, bei verschiedenen pH Werten. Rechts: das Signalvolumen von Trp3  $\text{H}^{\epsilon 1}$  fällt nur gering mit steigendem Druck im Vergleich zum Volumen des Ala4  $\text{H}^{\text{N}}$ -Signals.

In den Seitenketten zeigt einzig die  $\text{H}^{\epsilon}$ -Linie von Tryptophan eine stark nichtlineare Tendenz (Druckkoeffizienten  $\delta'_0=10,142\text{ppm}$ ,  $\delta'_1=-0,17\text{ppmGPa}^{-1}$ ,  $\delta'_2=0,47\text{ppmGPa}^{-2}$ ). Die chemische Verschiebung scheint bei 0,15 GPa bereits den minimalen Wert erreicht zu haben, wie Abb.4.14. zeigt. Bemerkenswert ist, dass das Signalvolumen nur gering und vor allem linear abnimmt. Eine Erklärung durch das Aufbrechen von Wasserstoffbrücken ist wegen des nahezu unveränderten Austauschverhaltens bei hohem Druck nicht wahrscheinlich, dies deutet eher daraufhin, dass sich das Amidproton in einer sterisch ungünstigen Position für Austausch befindet und das nichtlineare Druckverhalten z.B. durch die  $\text{H}^{\beta}$ -Atome des Ala4 bedingt sein könnte. Die Methylgruppe des Ala4 zeigt dementsprechend bei Tryptophan eine anomal hohe, aber streng lineare Druckabhängigkeit der  $\beta$ -Linien (Abb.4.15). Ursache dieser Anomalie könnten Ringstromeffekte durch druckabhängige Umorientierung des Rings zu Ala4 sein. Für dieses Verhalten von Tryptophan konnten keine Beschreibungen in der Literatur gefunden werden.



#### 4.2.7. Druckverhalten der skalaren Kopplungen

In den Tetrapeptiden konnte keine Druckabhängigkeit der  $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$  Kopplung innerhalb des Messfehlers von 2 Hz beobachtet werden. Eine druckbedingte Torsion der Peptidbindungen der kurzen Tetrapeptide, die aus der Karplusbeziehung errechnet werden könnte, ist damit nicht gegeben. Bedingt durch die geringe Länge der Peptide sind nur geringe sterische Einschränkungen der Drehung um die Einfachbindungen des Peptid-rückgrates gegeben. Änderungen der  $J$ -Kopplung sind damit auch nicht zu erwarten.

Im Gegensatz zu den Tetrapeptiden wurde in den Proteinen *TmCsp* (siehe Kapitel 3) und *HPr* (*S. Carnosus*) (Kalbitzer et al. 2000), eine deutliche Druckabhängigkeit festgestellt. Hier führt die Druckeinwirkung zu einer Torsion, des durch die Faltung gut festgelegten Protein-rückgrates, die sich in einer Änderung der  $J$ -Kopplungskonstanten äußert.

Da die Druckabhängigkeiten der als sensitive Strukturindikatoren bekannten  $\text{H}^\alpha$ -Protonen (Wishart et al. 1991) ebenfalls sehr gering sind, belegt dies die Konsistenz der Ergebnisse der Messungen von chemischer Verschiebung und  $J$ -Kopplung.

#### 4.2.8. Einfluß der benachbarten Aminosäuren auf den Druckgradienten

Wie Bundi und Wüthrich (1979b) für  $\text{H-Gly-Gly-X-Ala-OH}$  Peptide gezeigt haben, hat die Sequenz einen direkten Einfluss auf das Verhalten des C-terminalen Alanins. Die Druckmessungen, deren Daten im Anhang Tab.4.8.-4.16 zu finden sind, konnten dies bestätigen. Alle druckinduzierten Änderungen der Amidprotonen des terminalen Alanins wurden bereits in Abb.4.6. vorgestellt. Die  $\text{H}^\alpha$ - und  $\text{H}^\beta$ -Protonen folgen in den Abb.4.15.

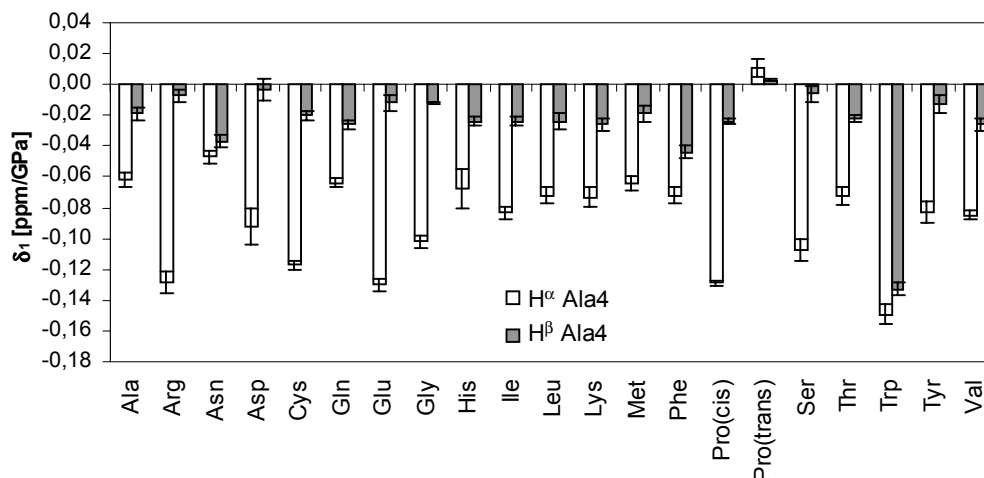


Abb.4.15. Lineare Druckkoeffizienten der  $\text{H}^\alpha$ - und  $\text{H}^\beta$ -Atome des C-terminalen Ala4. Auffallend ist die starke Druckabhängigkeit der  $\text{H}^\beta$ -Linie des auf Trp folgenden Alanins, Ursache ist vermutlich ein Ringstromeffekt. (pH 7,0 Tris/HCl Puffer)

Wie aus der Größe der Seitenketten leicht verständlich ist, zeigen sich geringe Druckabhängigkeiten für Vorgänger mit kurzen ungeladenen Seitenketten wie Alanin und Glycin. Auffallend ist der erhebliche Unterschied zwischen Prolin cis- und trans- Konformation in den Druckkoeffizienten (Abb.4.15.).

Die anormal starke Druckabhängigkeit in der Methylgruppe des Peptids Gly-Gly-Trp-Ala ( $\text{H}^\beta$  Ala4) ist wahrscheinlich auf einen Ringstromeffekt des benachbarten Tryptophans zurückzuführen.

In Tab.4.20. sind die von Chou und Fasman (1974) ermittelten Parameter  $\beta$ -Faltblatt Konformationsparameter  $P\beta$  angegeben. Diese Parameter geben an, inwieweit bestimmte Aminosäuren die Anordnung von  $\beta$ -Faltblättern unterstützen oder hindern. Die Bildung von Sekundärstrukturelementen wird durch die Seitenketten der Aminosäuren bestimmt, da diese die Diederwinkel des Proteinrückgrates in bestimmte Positionen zwingen. Gleichzeitig führen die Seitenketten auch zu einer Abschirmung der benachbarten Aminosäuren, sodass deren Austauschverhalten verändert wird, was auch die pH-Abhängigkeit der Amidprotonen beeinflusst. Daraus resultiert eine Korrelation von  $\beta$ -Faltblattkonformationsparametern mit den Titrationskurven der Amidprotonen, die von Bundi und Wüthrich (1979) festgestellt wurde. Da auch die Druckabhängigkeiten der Aminosäuren von benachbarten Aminosäuren abhängen, wurden die hier gemessenen Daten den Konformationsparametern in Tab.4.20. gegenübergestellt.

Ala4 X3	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_{\text{pH}}^{\text{a}}$	$P\beta^{\text{b}}$
Val	8,392	0,526	-0,543	H $\beta$
Ile	8,374	0,599	-0,531	H $\beta$
Met	8,353	0,536	-0,518	H $\beta$
Leu	8,301	0,522	-0,507	H $\beta$
Tyr	7,834	0,835	-0,472	H $\beta$
Thr	8,350	0,644	-0,460	H $\beta$
Gln	8,395	0,372	-0,451	H $\beta$
Gly	7,842	0,763	-0,423	i $\beta$
Trp	8,111	0,482	-0,412	H $\beta$
Ser	8,010	0,714	-0,364	B $\beta$

Tab.4.20. Vergleich der Änderung  $\delta_{\text{pH}}$  der chemischen Verschiebung bei Titration des Tetrapeptides GGXA nach den Werten von Bundi und Wüthrich (1979) mit den  $\beta$ -Faltblatt-Konformations Parameter  $P\beta^{\text{b}}$  nach den Werten von Chou und Fasman (1974). Induktion der Faltblatt Bildung: H $\beta$ : stark, h $\beta$ : moderat, i $\beta$ : indifferent, b $\beta$ : Bruch des Faltblattes. Wie ersichtlich unterscheiden sich die druckinduzierten Änderungen erheblich von den pH induzierten. Im Gegensatz zu den Titrationswerten korrelieren die Druckdaten nicht mit den  $\beta$  Faltblatt Konformationsparametern.

#### 4.2.9. Prolin cis-trans Isomerisierung

Die Peptidbindungen aller Aminosäuren kommen normalerweise nur in der gegenüber der cis Konformation energetisch bevorzugten trans Stellung vor. Die einzige Ausnahme bildet Prolin, das statt einer gestreckten Seitenkette einen geschlossenen Ring aus fünf Atomen vom C $^{\alpha}$  zum Stickstoff der Peptidbindung aufweist. Diese besondere Form bedingt die Einstellung eines dynamischen Gleichgewichtes von cis- zu trans-Konformation in der Peptidsequenz. Bedingt durch den partiellen Doppelbindungscharakter der Peptidbindung ist der Austausch zwischen beiden Isomeren relativ langsam und wurde in einigen Proteinen als zeitbestimmender Schritt der Proteinfaltung erkannt (Balbach 2000), der die zur Faltung notwendige Zeit vom Millisekunden in den Minutenbereich verschieben kann, sobald nicht native Isomere in die Sequenz eingebracht werden.

In der Zelle existieren Enzyme, die Prolylisomerasen, die gezielt den Übergang zwischen beiden Konformationen katalysieren und damit einerseits die Proteinfaltung steuern können, andererseits auch funktionelle Gruppen beeinflussen können. (Balbach 2000)

Beide Isomere können in der NMR eindeutig an der chemischen Verschiebung der Signale und der Signalintensität unterschieden werden. Die Integration beider Linien in den 1D- $^1\text{H}$ -Spektren erlaubt es druckinduzierte Gleichgewichtsverschiebungen in den Besetzungszahlen  $K = [\text{trans}]/[\text{cis}]$  beider Konformere festzustellen. Wegen Überlappung der Signale beider Konformere in den Seitenkettenresonanzen eignen sich die beiden sauber getrennten  $\text{H}^\alpha$ -Linien des Prolins am besten zur quantitativen Analyse. Wegen der Nähe des Wassersignals ist die Messung in 99 %  $\text{D}_2\text{O}$  unabdingbar.

Die Messung wurde zunächst in 5 mm Borosilikatglaskapillaren durchgeführt, im Druckbereich von 0 bis 0,2 GPa und 305 K blieb hier die Gleichgewichtskonstante  $K$  innerhalb der Fehlergrenzen unverändert. Nach Einführung der 3 mm Saphirzellen, die ein mehr als verdoppeltes Signal zu Rauschverhältnis bieten, ergab sich eine eindeutige Verschiebung von der trans- zur cis-Konformation bei steigendem Druck mit  $-0,37 \pm 0,05 \text{ GPa}^{-1}$ . Bei Normaldruck liegt das Verhältnis auf Seiten des trans-Konformers mit der Gleichgewichtskonstanten  $K = 3,381 \pm 0,008$ . Die Spektren von Prolin im Peptid GGPA (Tris/HCl-Puffer pH 7,0) mit Druck als Parameter sind in Abb.4.16. links dargestellt, rechts die Quotienten der beiden Signalvolumina. Die Korrektur der Basislinie und Integration wurde mit dem Programm XWinNMR von Bruker durchgeführt.

Dies steht in Widerspruch zu anderen Arbeiten (Drljaca 1998, Hauer 1980, Klimke 1981) in denen gezeigt wurde, dass Konformationsgleichgewichte nur dann verschoben werden, wenn diese mit dem Entstehen oder Verschwinden von lokalen Ladungen verbunden sind. Beispiele sind N-Acetyl-L-Prolin-NH-Methylamid und Glycylsarcosin (Hauer 1982). Eine mögliche Erklärung ist das Aufbrechen von  $\gamma$ -Schleifen formenden Wasserstoffbrückenbindungen nach dem oben erwähnten Modell von Némethy (1972).

Der größte Unterschied in beiden Konformeren des Prolins tritt bei  $\text{H}^\delta$ -Protonen auf, deren Druckkoeffizient  $\delta_1$  in cis-Stellung größer ist. Die Gleichgewichtsverschiebung der beiden Konformere wirkt sich auch auf das C-terminale Ala4 der Sequenz Gly-Gly-X-Ala aus.

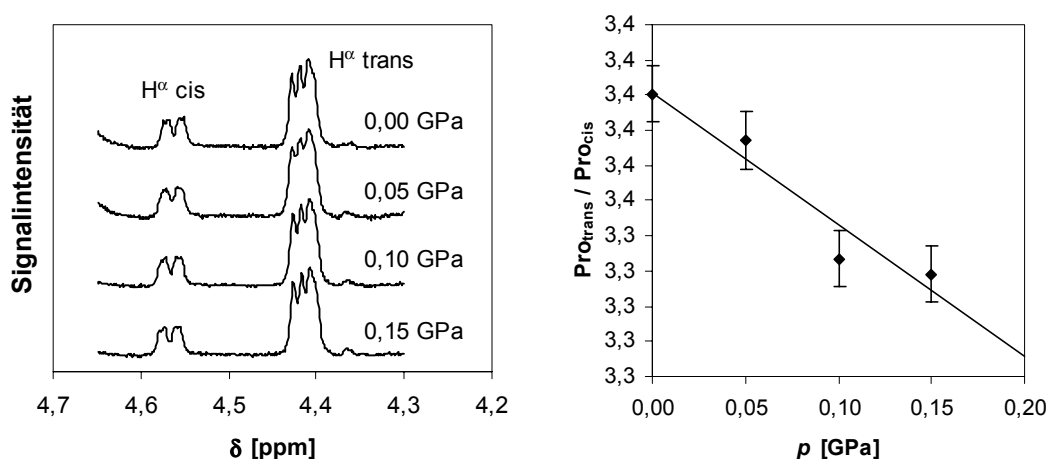


Abb.4.16. Links: Spektren der  $\text{H}^\alpha$  Protonen von Prolin im Peptid GGPA (Tris/HCl Puffer pH 7,0 99%  $\text{D}_2\text{O}$  ) Das kleine Signal stammt vom cis-, das größere vom trans- Konformer. Rechts: Gerade der Quotienten der Signalvolumina von trans- und cis-Konformer.

#### 4.2.10. Druckabhängigkeit der Signalvolumina und Austauschraten

Zum Abschluss des Kapitels über Tetrapeptide werden in Tab.4.21. die Daten der Druckabhängigkeit des Protonenaustausches mit dem umgebenden Wasser vorgestellt. Typische Spektren wurden bereits in Abb.4.8. gezeigt. Die Messungen fanden alle in Tris/HCl-Puffer bei pH 7,0 statt. Histidin wurde zusätzlich in Phosphatpuffer bei pH 6,2 gemessen. Wegen des hohen pH-Wertes sind zahlreiche Amidprotonenresonanzen nicht mehr sichtbar. Um die Vorsättigung austauschender Protonen zu verhindern, wurde das Wassersignal durch eine 3-9-19 Gradientenpulssequenz unterdrückt.

Der Leser mag bemängeln, dass nicht bei allen Messungen die Druckabhängigkeit des Austausches vermessen wurde, dies ist jedoch nicht sinnvoll, da mit steigendem Druck der pH der Lösung durch die Druckabhängigkeit des Phosphatpuffers sinkt. Ein sinkender pH bedingt jedoch eine Protonierung der Peptidbindungen, was dem Protonenaustausch entgegenwirkt.

In Tris/HCl-Puffer wird der Austausch nur durch Druck beeinflusst. Der Austausch zeichnet sich durch ein negatives Aktivierungsvolumen aus und wird mit steigendem Druck beschleunigt (Isaacs 1978), die Zunahme der Ladungsträger durch Dissoziation führt zu einer Reduktion des Gesamtvolumens von Lösungsmittel und Peptid.

Auffallend sind die unterschiedlichen Austauschraten der stereospezifisch unterscheidbaren pro-E und pro-Z Protonen, wie dies bei der Diskussion der Druckkoeffizienten in den Seitenketten schon erwähnt wurde.

Für das Ringproton  $H^{\epsilon 1}$  von His3 in Tris/HCl-Puffer zeigt sich eine Abnahme der integralen Signalintensität um 31 %, während diese in Phosphatpuffer nur 12 % beträgt. Dies ist insoweit erstaunlich, da dieses Proton fest an Kohlenstoff gebunden ist und damit Austausch nicht die Ursache sein kann. Dies könnte durch eine bei steigendem Druck zunehmende Interaktion mit Tris/HCl-Puffer bewirkt werden. Eine Aggregation oder Assoziation ist durch langsamere Rotation des gesamten Gebildes mit einer Verbreiterung der Signale verbunden. Eine Verbreiterung der Signale konnte nicht festgestellt werden, allerdings ist dazu eine nennenswerte Vergrößerung des gesamten Moleküls nötig, die durch eine Assoziation von Tris/HCl und Tetrapeptid nicht gegeben ist. Zudem wird der potentiellen Verlangsamung der Rotation durch eine Verringerung der Viskosität des Wassers mit steigendem Druck entgegengewirkt. Ein Signal mit umgekehrtem Vorzeichen der Druckabhängigkeit des Volumens an anderer Stelle des Spektrums konnte nicht identifiziert werden. Eine Verfälschung des Signalvolumens durch  $T_1$ -Relaxation ist nicht wahrscheinlich, da die Zeit zwischen den Pulsen mit einer Sekunde ausreichend bemessen war. Als Erklärung verbleibt ein zusätzlicher Zustand in langsamem Austausch, der durch seine geringe Intensität nicht sichtbar ist.

Tris/HCl Puffer pH 7,0				
X3	H <sup>N</sup> X3 [GPa <sup>-1</sup> ]	Seitenkettenprotonen [GPa <sup>-1</sup> ]		H <sup>N</sup> Ala4 [GPa <sup>-1</sup> ]
Ala	-3,7 ±0,1			-3,7 ±0,1
Arg	-4,4 ±0,7			-1,6 ±0,4
Asn		H <sup>δ21</sup>	-0,7 ±0,4	-4,4 ±0,7
Asn		H <sup>δ22</sup>	-1,0 ±0,6	
Asp	-2,1 ±0,2			-1,2 ±0,1
Cys	-3,8 ±0,2			-1,4 ±0,1
Gln		H <sup>ε21</sup>	-1,9 ±0,4	-3,7 ±0,3
Gln		H <sup>ε22</sup>	-1,9 ±0,4	
Gly	-4,0 ±0,3			-1,1 ±0,1
His		H <sup>δ2</sup>	-0,6 ±0,4	-0,6 ±0,5
His		H <sup>ε1</sup>	-1,5 ±0,1	
Ile	-3,3 ±0,2			-3,0 ±0,4
Leu				-3,0 ±0,1
Lys		H <sup>ζ</sup>	-2,1 ±0,3	-4,2 ±0,4
Met				-4,1 ±0,3
Phe				-4,2 ±0,2
Ser	-4,6 ±0,5			-1,4 ±0,2
Thr	-1,4 ±0,5			-1,4 ±0,3
Trp		H <sup>ε1</sup>	-1,2 ±0,1	-3,6 ±0,1
Tyr	-2,7 ±0,1	H <sup>δ1</sup> , H <sup>δ2</sup>	-0,5 ±0,1	-1,4 ±0,1
Tyr		H <sup>ε1</sup> , H <sup>ε2</sup>	-0,4 ±0,1	
Val	-2,6 ±0,1			-2,6 ±0,4
Phosphatpuffer pH 6,2				
His	0,5 ±0,1	H <sup>δ2</sup>	-0,7 ±0,1	-0,2 ±0,3
His		H <sup>ε1</sup>	-0,6 ±0,1	

Tab.4.21. Verhalten der Volumina aller links vom Wasser liegenden Signale. Die Wasserunterdrückung erfolgte mit einer 3-9-19 Pulsfolge, zur Vermeidung der Vorsättigung von austauschenden Protonen. Für GGAA war eine Unterscheidung der H<sup>N</sup>-Linien von Ala3 und Ala4 nicht möglich.

## 5. Hochdruck NMR am Kälteschockprotein *TmCsp*

### 5.1. Funktion und Eigenschaften der Kälteschockproteine

Proteine thermophiler Organismen zeichnen sich durch ihre hohe Thermostabilität aus, deren Ursachen auf molekularer Ebene bis heute nicht richtig verstanden sind. Eine wichtige Familie thermostabiler Proteine stellen die Kälteschockproteine (*Csp*) dar, die eine Untergruppe kälteinduzierter Proteine vieler meso- und thermophiler Prokaryonten sowie einiger Eukaryonten bilden. Sobald die Umgebungstemperatur unter den physiologisch zuträglichen Bereich der Zelle fällt, werden die Kälteschockproteine vermehrt exprimiert, während die Expression der für den Stoffwechsel und Fortpflanzung notwendigen Proteine drastisch reduziert wird. Für *Thermotoga maritima* (*TmCsp*) ist Wachstum von 55 °C bis 90 °C mit einem Optimum bei 80 °C möglich (Welker 1999), bei tieferen Temperaturen beginnt die Expression von *TmCsp*, als Antwort auf den Kälteschock.

Die Funktion der *Csp* ist bisher nicht eindeutig geklärt, sie zeigen jedoch eine hohe Affinität zu Einzelsträngen von Nukleinsäuren (Lopez et al. 1999). Die von Graumann et al. (1998) beschriebene Regelung der Translation durch Bildung von RNA Chaperonen ist die derzeit am stärksten favorisierte Theorie zur Funktion von Kälteschockproteinen.

Die bisherigen Kenntnisse der Thermostabilität von Proteinen beruhen hauptsächlich auf Homologieuntersuchungen der Sequenzen und Strukturen von Proteinen meso- und thermophiler Organismen (Mueller et al. 2000). In Tab.5.1. sind die Sequenzen der *Csp* einiger Prokaryonten dargestellt (Kremer et al. 2000), die farbig gekennzeichnete Bereiche zeigen den hohen Grad der Homologie dieser Proteinfamilie.

	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\beta_4$	$\beta_5$
TmCsp	---MRGKVKWFEDSKKGYSFITKDEG---GVFVH---WSAEME---FKTKKEGQVVEFEIQE---KKGQPAHVKVVE---				
BsCspB	---MQRGKVKWFNNEKGYSFIEVEGG---SVFVH---FTAQGEFCKTKEEGQVVEFEIQE---KKGQPAHVKVVE---				
BsCspB	---MLEGKVKWFNNEKGYSFIEVEGG---SVFVH---FTAQGEFCKTKEEGQVVEFEIQE---KKGQPAHVKVVE---				
BsCspA	MSGKMTGIVKWFNQDKGFGFITPDDGSKIVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTSL---				
CSPB_ECOLI	MSNKMGTGLVKWFNADKGGFISPVDSKIVFVH---FSAIQNDNYRTTFEGQKVTSTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPC_ECOLI	MA-KIKGQVKWFNNEKGYSFIEVEGG---TPADGSKIVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPD_ECOLI	---MKGGIVKWFNNAKGGFICPEEGGGEIIFAH---YSTIQMDGYRTTKAGQSVQFDVHQKPKNHASVIVPVEVEAAVA---				
CSPB_ECOLI	MS-KIKGKVKWFNNEKGYSFIEVEGG---TPEDGSKIVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSP1_ECOLI	MSNKMGTGLVKWFNPEKGGFITPKDGSKIVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPC_BACSU	---MEQGTIVKWFNAEKGGFITERENG---DVVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPD_BACSU	---MQNGKVKWFNNEKGGFITVEVEGG---DVVFVH---FTAQGEFCKTKEEGQVVEFEIQE---KKGQPAHVKVVE---				
CSPB_BACST	---MQRGKVKWFNNEKGYSFIEVEGG---SVFVH---FTAQGEFCKTKEEGQVVEFEIQE---KKGQPAHVKVVE---				
CSPA_BACCE	---MTVTGQVKWFNNEKGGFITVEPGE---NDVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPB_BACCE	---MNGKVKWFNNEKGGFITMEEGS---DVVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPC_BACCE	---MQGRVKWFNAEKGGFITEREDG---DVVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPD_BACCE	---MQTGKVKWFNNEKGGFITVEVEGG---DVVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPB_BACCE	---MTLTGKVKWFNNEKGGFITEVADG---SVVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPA_LISMO	---MQGTIVKWFNAEKGGFITERENG---DVVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPB_LISMO	---MQTGKVKWFNNEKGGFITVEVEGG---DVVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSP1_LACPL	---MKNGTVKWFNADKGYSFITGEDG---NDVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSP2_LACPL	---MKNGTVKWFNADKGGFITGEDG---TVVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSP7_STRCL	---MATGTIVKWFNAEKGGFITAQDGGGPPVFAH---YSAINATGFRSDEENOVNNDVTHSE---GPOANVSPA---				
CSPF_STRCO	---MASGTIVKWFNNEKGGFITPDDGSKIVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPA_SALTY	MSGKMTGIVKWFNADKGGFITPDDGSKIVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPA_STIAU	---MATGTIVKWFNADKGGFITPDDGSKIVFVH---FSAIQNDGYKSLDE---QKKSFTIESAKGPAAANVTITD---				
CSPA_PSEAE	MSNRQNGTVKWFNADKGGFITPDESS---NDVFVH---FRSQTGTFKSLKEGQVVEFEIQE---KKGQPAHVKVVE---				
CAPA_PSEFR	MSQRQSGTVKWFNDEKGGFITPQGGDGLFVH---FKAESDGFKSLKEGQVVEFEIQE---KKGQPAHVKVVE---				
CAPB_PSEFR	MSNRQGTIVKWFNDEKGGFITPQSG---DGLFVH---FKAQSDGFKSLKEGQVVEFEIQE---KKGQPAHVKVVE---				
CSP_ARTGO	---MAQGTIVKWFNAEKGGFITPDDSDGIVFVH---YSEIQTGTFKSLKEGQVVEFEIQE---KKGQPAHVKVVE---				
CSPD_HAEIN	---MEIGTVKWFNNAKGGFITSAEGVDIAIFAH---YSVLEMDGYRS---KAGGKQVFEVLHSDKSHATKTIPIADTQE---				

Tab.5.1. Sequenzhomologien von 30 prokaryotischen *Csp* Sequenzen, entnommen aus Kremer et al. (2001). Aminosäuren mit einer Homologie größer als 80 % sind rot, größer als 60 % sind gelb und mehr als 40 % sind blau eingefärbt.

Das Repertoire stabilisierender Mechanismen und deren Kombinationsmöglichkeiten scheint sehr vielschichtig zu sein. Beispiele sind die Verkürzung von Schleifen, Immobilisierung der C- und N-Termini (Auerbach et al. 1998), oder Erhöhung der Packungsdichte (Karshikoff & Lauenstein 1998).

Dynamische Untersuchung an Kälteschockproteinen wurden von Schindler und Schmid (1996) durchgeführt. Stopped-flow Messungen in Abhängigkeit von der Konzentration denaturierender Agenzien wie Harnstoff und in Abhängigkeit von der Temperatur zeigten die extrem schnellen Faltungsreaktionen des Kälteschockproteins *CspB* von *Bacillus subtilis*, die im Bereich weniger Millisekunden liegen. Die außerordentlich hohe Geschwindigkeit der Faltung erlaubt nicht die Identifizierung von Faltungsintermediaten. Jacob et al. (1996) konnte mit einer Drucksprungapparatur eine Zeitauflösung unter einer Millisekunde erreichen. Auch hier zeigten sich keine Faltungsintermediate, die Änderung der Fluoreszenz folgte nahezu dem Druckverlauf. Für die Faltung von *CspB* wurde eine Zeitkonstante von 40  $\mu$ s abgeschätzt. Diese Zeitkonstante steht in Widerspruch zu anderen Veröffentlichungen, die den *Csp* aus den mesophilen Organismen *B. subtilis*, *B. caldolyticus*, und *E. coli* Faltungszeitkonstanten von wenigen Millisekunden zuschreiben (Welker 1996).

Diese Daten geben, bedingt durch die auf Fluoreszenz oder Circular dichroismus beruhenden Verfahren, keinen Einblick in die Vorgänge auf atomarer Ebene im Protein. Um ein tieferes Verständnis der stabilisierenden Mechanismen zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit das Kälteschockprotein *TmCsp* des hyperthermophilen Bakteriums *Thermotoga maritima* mit Methoden der NMR unter extremen Druck- und Temperaturbedingungen untersucht. Der betrachtete Bereich erstreckte sich von 275 K bis 339 K bei Drücken von 0,1 - 200 MPa. Zusätzlich wurden Experimente bei 200 MPa im Bereich der Tieftemperaturdenaturierung bis 255 K angestellt. Zur Übersicht sind in Tab.5.2. die vermessenen  $p$ ,  $T$  Punkte mit Angabe des dort aufgenommen NMR-Spektrentyps dargestellt. Bisherige NMR-Messungen an *TmCsp* beschränkten sich auf die Bestimmung von Strukturen unter Normaldruck bei 303 K durch Kremer et al. (2000) und 333 K und 353 K durch Bamann et al. (2001).

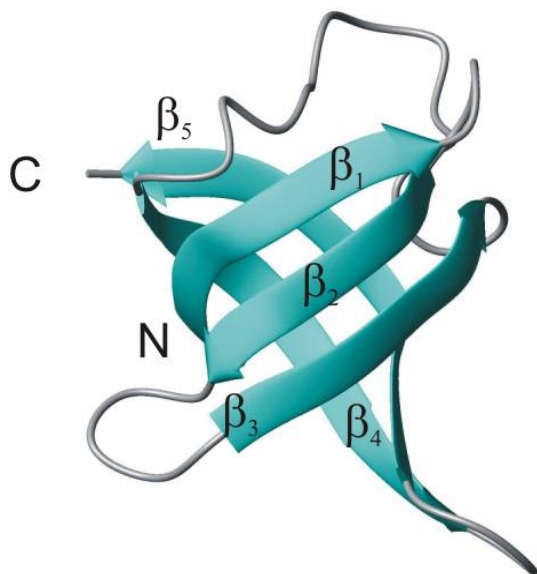


Abb.5.1. Struktur des *TmCsp* nach Kremer et al. (2000). Fünf  $\beta$ -Stränge formen mit zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern ein  $\beta$ -Fass.

Die in Abb.5.1. dargestellte NMR-Struktur von *TmCsp* zeigt das typische Faltungsmotiv aller *Csp* mit fünf  $\beta$ -Strängen in zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die eine sogenannte  $\beta$ -Fass-Struktur formen (Kremer et al. 2000). Die  $\beta$ -Stränge umfassen die Aminosäuren R2-D9, G13-K19, D24-W29, G43-Q51 und Q58-V65 (Kremer et al. 2000). Die molekulare Masse von *TmCsp* beträgt 7474 D, bei einer Länge von 66 Aminosäuren. In der Sequenz ist an Position 57 Prolin zu finden, Cystein ist nicht vorhanden. Beide Aminosäuren zeichnen sich durch ihre verlangsamende Wirkung auf die Proteinfaltung aus. (Schmid & Balbach 2000). Cystein beeinflusst die Faltungsgeschwindigkeit durch die Möglichkeit zur Bildung von Disulfidbrücken, während Prolin durch den Wechsel zwischen cis- und trans-Stellung im Proteinrückgrat hemmend auf die Proteinfaltung einwirken kann. Ein Umschalten zwischen beiden Konformeren

mittels Prolinisomerasen (Schmid & Balbach 2000) ermöglicht der Zelle ein Protein zeitweise zu aktivieren oder zu deaktivieren, um regelnd auf Vorgänge des Stoffwechsels einzuwirken. Speziell für *TmCsp* konnten keine Hinweise in der Literatur gefunden werden, ob Prolin 57 die Faltungsgeschwindigkeit oder Funktion des Proteins nennenswert beeinflusst. Soweit aus der Homologietabelle Tab.5.1. der Kälteschockproteine ersichtlich, gehört Prolin nicht zu den

durchgängig konservierten Aminosäuren, was gegen eine wichtige Funktion dieser Aminosäure spricht. Für eine genauere Beschreibung der funktionalen Aufgaben des Prolins wäre eine direkte Beobachtung mittels NMR-Spektroskopie notwendig. Dies ist hier jedoch kaum möglich, da Prolin kein Amidproton besitzt, das die Grundlage der hier verwendeten  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -HNCO Experimente ist. Eine Betrachtung der Seitenkettenresonanzen ist aufgrund der hohen Zahl von Signalüberlappungen nicht möglich. Dies macht eine direkte Beobachtung des Prolins unmöglich, Aussagen über das Verhalten sind damit nur indirekt durch die in der Sequenz benachbarten Aminosäuren möglich.

Die Aufgabe von *Csp* in *Thermotoga maritima* besteht, wie vermutet wird, in der Bindung von RNA bei Unterschreitung der Umgebungstemperatur, um eine weitere Translation zu verhindern. Um diese Funktion ausführen zu können, müssen einige Aminosäuren dergestalt in die Gesamtstruktur des Proteins eingebunden sein, dass diese eine erhöhte Affinität zu RNA zeigen. Die vermutete RNA-Bindestelle wird durch die Aminosäurereste K6, W7, K12, F16, F26, H28, W29, K55, K11 und K54 gebildet (Welker 1996). Insbesondere das in allen Kälteschockproteinen konservierte Tryptophan W7 zeigte bei den vorliegenden Messungen ein auffälliges temperaturabhängiges bistabiles Verhalten, das erst durch Anwendung von Druck sichtbar wurde. Diese temperaturgesteuerte Umordnung des Tryptophans belegt die herausragende funktionale Bedeutung von W7 in der Familie der Kälteschockproteine.

Neben der RNA-Bindestelle existiert ein weiterer Bereich, dem ein entscheidender Einfluss auf das Verhalten von *TmCsp* zugesprochen wird. Dieser Ionencluster, bestehend aus den Resten D20, E47 und K63 sowie R2 als zentralem Element, wird als Ursache der hohen thermischen Stabilität von *TmCsp* angesehen (Kremer et al. 2001). Arginin 2 ist ausschließlich in den thermophilen Mitgliedern der Familie der Kälteschockproteine zu finden, was dessen Bedeutung zur thermischen Stabilisierung unterstreicht.



## 5.2. Proteinfaltung und Denaturierung

Innerhalb eines Proteins existiert eine nahezu unbegrenzte Zahl von Orientierungsmöglichkeiten der einzelnen Aminosäuren zueinander, die exponentiell mit der Länge der Peptidkette zunimmt. Würden bei der Faltung des Proteins von der gestreckten Kette zur nativen Konformation alle Zwischenzustände angenommen, liefe der Faltungsprozess auf Zeitskalen weit jenseits biologisch sinnvoller Werte ab. Dieser, als Levinthal'sches Paradoxon (Levinthal 1969) bezeichnete, Widerspruch kann durch die Existenz von Schwellen erklärt werden, die einen, oder mehrere stark eingegrenzte, Wege in der „Energielandschaft“ möglicher Faltungen zum nativen Zustand des Proteins vorgeben (Zwanzig 1992). Abb.5.2. verdeutlicht die Auflösung des Paradoxons durch „Faltungstrichter“ verschiedener Ausformung, die eine mehr oder weniger starke Führung des Faltungsweges bedingen. Die Tiefe des Trichter symbolisiert den Unterschied der freien Energie  $\Delta G$  zwischen verschiedenen Faltungszuständen, die Breite des Trichters beschreibt die Entropie. Wird das Protein vom ungefalteten Zustand in die native Struktur überführt, nimmt dessen Entropie und freie Energie ab.

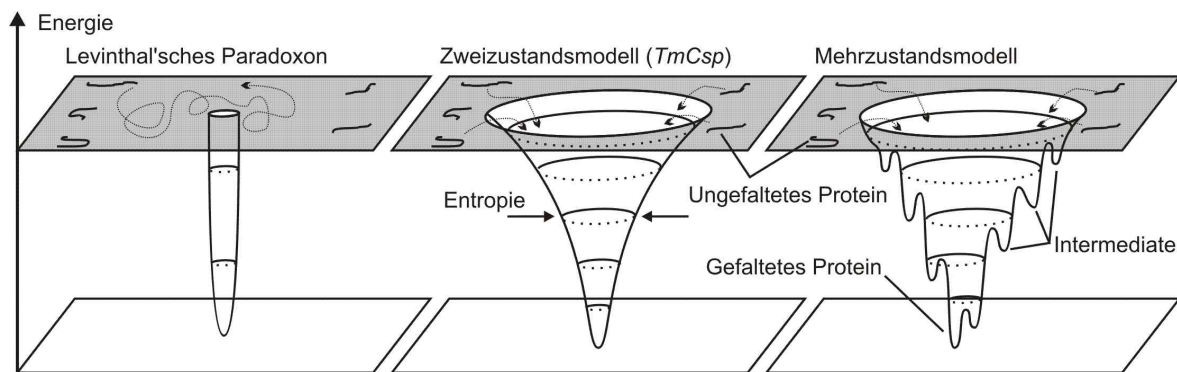


Abb.5.2. Links: Die ungefalteten Proteine falten sich durch Zufall gesteuert und können innerhalb biologisch relevanter Zeitskalen ihren Weg zur nativen Faltung nicht finden. Mitte: die Proteine werden durch stetigen Verlust der freien Energie zur nativen Faltung geführt. Hier existieren nur der gefaltete und der ungefaltete Zustand, dieses Modell gilt für *TmCsp*. Rechts: In diesem Mehrzustandsmodell existieren diverse Energieminima, die auf dem Weg zur nativen Faltung angenommen werden. Das Protein verharnt in Form dieser Intermediate solange, bis durch zufällige Vorgänge ausreichend Energie zur Überwindung der Potentialwälle zugeführt wird. Über metastabile Intermediate wird auch in diesem Fall durch das Minimum der freien Energie sukzessive die native Faltung gebildet (modifiziert nach Schultz 2000).

Im einfachsten Fall erfolgt die Faltung direkt vom ungefalteten Zustand  $U$  in den gefalteten Zustand  $F$ , entsprechend einem Zweizustandsmodell ohne jegliche Intermediate, mit den Geschwindigkeitskonstanten  $k_F$  und  $k_D$  für Faltung und Denaturierung (Abb.5.1. Mitte). Die Gleichgewichtskonstante  $K$  errechnet sich aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstante oder den Populationen des gefalteten  $N_F$  und ungefalteten  $N_U$  Zustandes.



$$K = \frac{k_F}{k_D} = \frac{N_F}{N_D} \quad (\text{Gl.5.2.})$$

Treten Intermediate auf, können dies einerseits Zustände sein, die in lokalen Energieminima gefangen sind, andererseits auch Zwischenzustände, die durch langsam ablaufende Vorgänge wie z.B. Bildung von Disulfidbrücken oder Prolin cis- trans-Isomerisierung bedingt werden. Die Höhe der Energiebarrieren, die den „Faltungskanal“ eingrenzen, liegt wesentlich über der thermischen Energie  $RT \approx 2,5 \text{ kJmol}^{-1}$  bei Raumtemperatur. Innerhalb dieser Potentialtöpfe stellt sich ein Gleichgewicht verschiedener Konformere des Proteins in schnellem Austausch ein. Durch moderate Änderung von Druck oder Temperatur kann das Besetzungsgleichgewicht der Zustände variiert werden. Diese Verschiebung des Gleichgewichts weg von der mittleren Struktur niedrigster Energie, führt zur verstärkten Besetzung von Zuständen die unter Normalbedingungen nur gering besetzt sind. In der Literatur werden diese als „low lying excited states“, oder niedrig liegende angeregte Zustände bezeichnet (Akasaka & Li 2001, Baxter et al. 1998).

Die Abhängigkeit von Druck und Temperatur ist durch die van't Hoff Beziehung für die Gibbs'sche freie Enthalpie  $\Delta G$  mit der Gleichgewichtskonstanten  $K$ , der allgemeinen Gaskonstanten  $R$  und der Temperatur  $T$  gegeben.

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (\text{Gl.5.3.})$$

Die freie Enthalpie, und damit die Lage des Gleichgewichtes, kann durch Modifikation von Druck  $p$  und Temperatur  $T$  verändert werden. Der Unterschied  $\Delta G = G_D - G_F$  der Enthalpie zwischen denaturiertem und gefaltetem Zustand, wird durch Gl.5.4.a. ausgedrückt (Bridgman 1915, Akasaka 2001). Diese kann für Quotienten  $T/T_0 \approx 1$  durch Reihenentwicklung, unter Berücksichtigung des linearen und quadratischen Terms, in die von Heremans (1998) genannte Gl.5.4.b. Form übergeführt werden.

$$\begin{aligned} \Delta G_{D-F} &= \Delta H_{D-F} - T\Delta S_{D-F} + p\Delta V_{D-F} = \\ \Delta G_0(T_0, p_0) - \Delta S_0(T - T_0) - \Delta C_p \left[ T \left( \ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] - \\ &+ \Delta V_0(p - p_0) - \frac{\Delta\beta}{2}(p - p_0)^2 + \Delta\alpha(p - p_0)(T - T_0) + \dots \end{aligned} \quad (\text{Gl.5.4.a.})$$

$$\begin{aligned} \Delta G_{D-F} &= \Delta G_0(T_0, p_0) - \Delta S_0(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 - \\ &+ \Delta V_0(p - p_0) - \frac{\Delta\beta}{2}(p - p_0)^2 + \Delta\alpha(p - p_0)(T - T_0) + \dots \end{aligned} \quad (\text{Gl.5.4.b.})$$

Die Größe  $\Delta\beta$  repräsentiert die Druckabhängigkeit der Kompressibilität, der Vorfaktor  $\Delta\alpha$  des Mischterms von  $p$  und  $T$  die thermische Änderung der „Expansibilität“ (Akasaka & Yamada 2001).  $\Delta S_0$  ist die Entropie des Systems und  $\Delta C_p$  die Änderung der Wärmekapazität mit der Temperatur.

Setzt man Gl.5.4.b. und Gl.5.3. gleich, kann aus der Gleichgewichtskonstanten  $K$  durch Messungen von Druckreihen bei konstanter Temperatur die Kompressibilität  $\Delta V_0$  und  $\Delta\beta$

bestimmt werden. Bei Variation der Temperatur kann die Änderung von Wärmekapazität  $\Delta C_p$  und Entropie  $\Delta S_0$  über Temperaturmessreihen bei konstantem  $p$  bestimmt werden.

Die Parameter  $\Delta T$  und  $\Delta p$  aus Gl.5.4.b. spannen einen Phasenraum auf, in dem sich das Protein durch Umordnung der Faltung bewegen kann. Das in Abb.5.3. links dargestellte Phasendiagramm zeigt die verschiedenen Möglichkeiten zur Denaturierung eines Proteins mit den Parametern Druck und Temperatur. Innerhalb der Phasenellipse ist  $\Delta G_{F-D}$  nach Gl.5.4.b. positiv, das Protein befindet sich hier im Zustand nativer Faltung, während es bei negativen Werten als denaturiert angesehen wird. Abb.5.3. rechts zeigt dies am Beispiel der Hitze und Kältedenaturierung. Innerhalb eines gewissen Temperaturbereichs ist das Protein gefaltet mit einem deutlichen Maximum der Stabilität. Zu höheren oder tieferen Temperaturen hin entfaltet sich das Protein. Vergleichbare Darstellungen sind bei Akasaka (2001), Heremans (1998) und (Nölting 1999) zu finden.

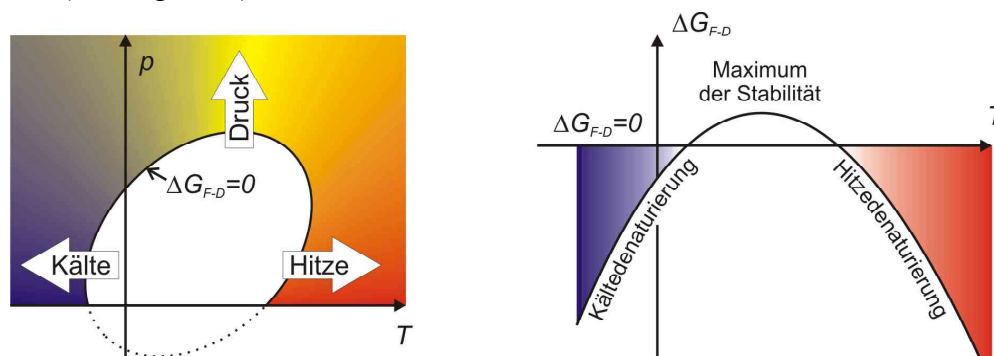


Abb.5.3. Das Protein lässt sich durch Hitze, Kälte und Druck aus dem gefalteten Bereich, innerhalb der Phasenellipse (links) mit positiver Gibbs'scher freier Enthalpie, in den ungefalteten Zustand überführen. (modifiziert nach Heremans 1998). Das Maximum der Enthalpie definiert die Temperatur maximaler Stabilität des Proteins (Nölting 1999)

Bei Anwendung von Druck ergeben sich sowohl Auswirkungen auf die Hydrathülle des Proteins, als auch auf die im Protein befindlichen Kavitäten (Abb.5.4.). Die im Experiment beobachteten Variationen des Gesamtvolumens von Protein und Lösungsmittel setzen sich additiv aus den Komponenten der Volumenänderungen der Hydrathülle und der Kavitäten zusammen. Eindringen von Wasser, durch stärkere Druckanwendung in sonst nicht zugängliche Kavitäten, führt ebenfalls zu Volumenänderungen. Wässrige Lösungen einzelner Aminosäuren zeigen eine geringere Kompressibilität als reines Wasser, die Werte bewegen sich von  $-28$  bis  $-62 \text{ GPa}^{-1}$  (Heremans 1998). Im Gegensatz dazu liegt die Kompressibilität gefalteter Proteine von  $+200$  bis  $+1500 \text{ GPa}^{-1}$  (Heremans 1998). Demzufolge muss der Zusammenbruch von Kavitäten und die Vergrößerung der Oberfläche bei der Entfaltung von Proteinen der wesentliche Faktor für Volumenänderungen sein. Durch die Entfaltung werden polare Gruppen an der Oberfläche für das Wasser zugänglich. In der polaren Umgebung des Wassers führt dies zu einer Reduktion des Volumens der Hydrathülle. Das System weicht gemäß dem Le Chatelier'schen Prinzip durch Verkleinerung des Volumens dem äußeren Zwang aus.

Die Abnahme der Viskosität von Wasser bei steigendem Druck unterhalb von 300 K und die Verkleinerung des Volumens der Hydrathülle bei Entfaltung reduzieren die Wechselwirkungen der Proteine untereinander. Die Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Proteinaggregaten, die einer Rückfaltung des Proteins entgegenstehen würden, sinkt damit. Aus den genannten Gründen ist die Druckdenaturierung reversibel, soweit die angewandten Drücke unter dem Druck maximaler Beweglichkeit des Wassers von etwa 250 MPa (siehe Kapitel 3) liegen. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass irreversible Druckdenaturierungen bei Lebensmitteln erst ab ca. 270 MPa auftreten (z.B. Hubbard 2001).

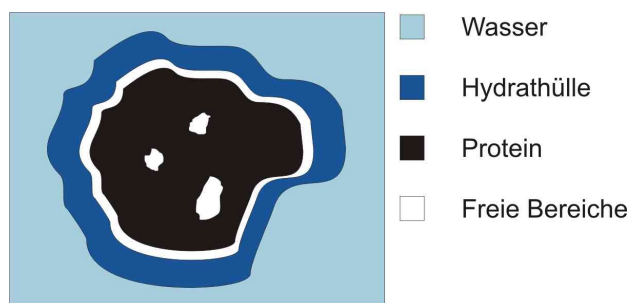


Abb.5.4. Das Protein ist in wässriger Lösung von einer Hydrathülle umgeben. Aufgrund sterischer Hemmung bilden sich innerhalb des Proteins Kavitäten aus, die für Wasser unter Normalbedingungen nicht zugänglich sind. Zunehmender Druck kann auch diese Bereiche hydratisieren. (modifiziert nach Heremanns 1998)

Kavitäten entstehen während des Faltungsprozesses durch Abkehr hydrophober Seitenketten des Proteinrückgrates vom Wasser, dies wird als hydrophober Kollaps bezeichnet. Mit sinkender Temperatur nimmt die Stärke der Wechselwirkung hydrophober Seitenketten untereinander ab, gleichzeitig steigt jedoch die Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen polaren Seitenketten untereinander und mit Wasser (Makhatadze & Privalov 1993). Wie in Kapitel 3 ausgeführt, nehmen mit fallender Temperatur auch die strukturbildenden Eigenschaften des Wassers zu, sodass eine entfaltete Struktur des Proteins innerhalb des Lösungsmittels Wasser energetisch günstiger ist. Da bei tieferen Temperaturen das Protein in einer stabileren Wasserstruktur eingebettet ist, kann es kaum zu Wechselwirkungen mit anderen Proteinen kommen. Eine Aggregatbildung, die eine erneute Faltung in die native Konformation mit steigender Temperatur vereiteln würde, wird somit verhindert.

Bei Messungen unter Normaldruck setzt der Gefrierpunkt des Wassers bei 273 K der Kältedenaturierung Grenzen. Diese Grenze kann bei Drücken von 200 MPa bis zu 253 K

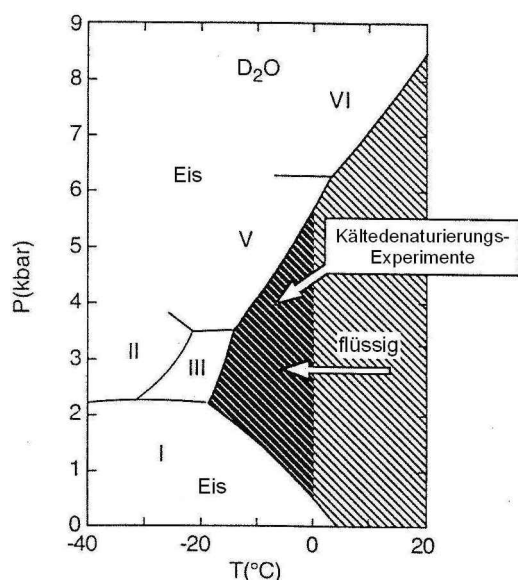


Abb.5.5. Das Phasendiagramm zeigt den flüssigen Bereich von Wasser bei erhöhtem Druck unterhalb von 0°C (modifiziert nach Jonas 1982).

heruntergesetzt werden. Das Phasendiagramm des Wassers aus der Arbeit von Jonas (1982) Abb.5.5. zeigt den bei höheren Drücken zusätzlich zur Verfügung stehenden Temperaturbereich in flüssigem Wasser.

Der Tieftemperaturdenaturierung unter Hochdruck vergleichbare Ergebnisse liefern Denaturierungsexperimente mit chemischen Agenzien wie Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff, die eine vollständige Denaturierung oberhalb des Gefrierpunktes ermöglichen (Nölting 1999). Die denaturierende Wirkung beruht auf dem Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen im Protein, wie im umgebenden Wasser, durch das verwendete Agens. Auch diese Methode zur Denaturierung ist reversibel, da Aggregatbildung zwischen Proteinen verhindert wird. Möglich sind jedoch ungewollte Wechselwirkungen zwischen Protein und denaturierendem Stoff, sodass die Anwendung von Hochdruck vorteilhafter ist.

Steigert man dagegen die Temperatur oberhalb des stabilen Bereichs der Proteine, so nimmt die Länge

der Wasserstoffbrücken aufgrund thermischer Bewegungen zu (Tilton et al. 1992) gleichzeitig nimmt aber der Ordnungszustand des Wassers ab, sodass Brückenbindungen zwischen den Proteinen möglich werden. Dies wird verstärkt durch eine weitgehend lineare Zunahme der hydrophoben Wechselwirkung mit der Temperatur, die ebenfalls verstärkende Wirkung auf die Aggregatbildung hat. (Privalov & Makhatdze 1993). Damit bilden sich bei der Hochtemperaturdenaturierung Aggregate von Proteinen, die eine Rückfaltung in den nativen Zustand verhindern.

### 5.2.1. Messungen von Gleichgewichten in der NMR

Die NMR bietet die Möglichkeit zur quantitativen Messung von Austauschvorgängen, z.B. des Protons in der Amidbindung mit dem umgebenden Wasser, oder den Übergang zwischen verschiedenen Proteinstrukturen bei der Faltung. Das NMR Signal hängt bei Austauschvorgängen zwischen verschiedenen Zuständen von der Austauschkorrelationszeit  $\tau$  der Reaktion und damit von den Versuchsparametern ab. Austauschvorgänge, deren Zeitkonstante  $\tau$  wesentlich größer als die Differenz der zugehörigen Resonanzfrequenzen eines Spektrums sind, liefern entsprechend der unterschiedlichen chemischen Umgebung der Zustände getrennte Linien, während bei schnellem Austausch oberhalb der Koaleszenztemperatur die Linien zusammenfallen.

Bei getrennten Linien ist die Lage des Gleichgewichts direkt aus den Verhältnissen der Peakvolumina der am Austausch beteiligten Zustände ablesbar. Ist der Austausch jedoch zu schnell um getrennte Linien zu erhalten, entspricht die chemische Verschiebung  $\delta$  der gemeinsamen Linie, dem nach Signalvolumen  $x_1$  und  $x_2$  gewichteten Verhältnis der chemischen Verschiebungen  $\delta_1$  und  $\delta_2$  der Einzellinien.

$$\delta = x_1\delta_1 + x_2\delta_2 \quad (\text{Gl.5.5.})$$

Der Quotient aus  $x_1$  und  $x_2$  entspricht wiederum der Gleichgewichtskonstanten  $K$ . Voraussetzung ist in diesem Fall die Kenntnis der chemischen Verschiebungen  $\delta_1$  und  $\delta_2$  der nicht gemischten Systeme im Zustand 1 und 2, oder die Kenntnis des Kurvenverlaufs beim Übergang vom Zustand 1 zum Zustand 2.

Durch Einsetzen von Gl.5.5. in die van't Hoff Relation Gl.5.3. und Auflösen nach  $K$  erhält man eine Verknüpfung zwischen den thermodynamischen Größen und der chemischen Verschiebung.

$$\delta = \frac{\delta_2 + \delta_1 e^{-a}}{1 + e^{-a}} \quad (\text{Gl.5.6.})$$

$$a = -\frac{\Delta G}{RT}$$

Gl.5.6. beschreibt eine sigmoide Kurve, die die chemische Verschiebung schnell austauschender Vorgänge in Abhängigkeit von der Lage des Gleichgewichts angibt. Wie im Kapitel über die Tetrapeptide sollen auch für *TmCsp* die chemischen Verschiebungen durch ein quadratisches Polynom gemäß Gl.5.7. berechnet werden.

$$\delta'(p) = \delta'_0 + \delta'_1(p - p_0) + \delta'_2(p - p_0)^2 \quad (\text{Gl.5.7.})$$

Setzt man in Gl.5.4. konstante Temperatur voraus und variiert nur den Druck, so vereinfacht sich diese zu Gl.5.8.

$$\Delta G = \Delta G_0(T_0, p_0) + \Delta V_0(p - p_0) - \frac{\Delta \beta}{2}(p - p_0)^2 \quad (\text{Gl.5.8.})$$

Die Ähnlichkeit zwischen den zur Beschreibung des Kurvenverlaufs verwendeten quadratischen Polynomen (Gl.5.7.) und der Formel der Gibbs'schen freien Enthalpie (Gl.5.8.) legt es nahe, einen Zusammenhang zwischen der chemischen Verschiebung und den thermodynamischen Größen  $\Delta G_0$ ,  $\Delta V_0$  und  $\Delta \beta$  herzustellen.

Dazu kann Gl.5.6. durch geeignete Transformationen in die Funktion des Tangens hyperbolicus umgewandelt werden. Ersetzt man die chemischen Verschiebungen  $\delta_1$  und  $\delta_2$  durch den Abstand  $\delta_\Delta = \delta_1 - \delta_2$  zu einer gemeinsamen Mittellinie mit der chemischen Verschiebung  $\delta_m = (\delta_1 + \delta_2) / 2$ , so resultiert folgende Umformung.

$$\delta = \frac{(\delta_m + \delta_\Delta) + (\delta_m - \delta_\Delta)e^{-a}}{1 + e^{-a}} = \delta_m + \delta_\Delta \frac{1 - e^{-a}}{1 + e^{-a}} \quad (\text{Gl.5.9.})$$

Durch Erweiterung des Quotienten mit  $e^{-a/2}/e^{-a/2}$  erhält man die Exponentialschreibweise des Tangens hyperbolicus für den eine Reihenentwicklung existiert.

$$\frac{e^{-a/2} - e^{a/2}}{e^{-a/2} + e^{a/2}} = \tanh(a/2) = (a/2) - \frac{(a/2)^3}{3} + \frac{(a/2)^5}{5} - \dots \quad (\text{Gl.5.10.})$$

Verwendet man nur das lineare Glied aus Gl.5.10. und setzt Gl.5.8. ein, so folgt mit Gl.5.9. und Gl.5.6. die gewünschte Beziehung (Gl.5.11.) zwischen den linearen und quadratischen Koeffizienten des Polynoms Gl.5.7. und Gl.5.9.

$$\delta = \delta_m + \delta_\Delta \left( \frac{-\Delta G}{2RT} \right) = \delta_m + \delta_\Delta \left( \frac{\Delta G_0(T_0, p_0) + \Delta V_0(p - p_0) - \frac{\Delta \beta}{2}(p - p_0)^2}{2RT} \right) \quad (\text{Gl.5.11.})$$

Entsprechend sind die Verhältnisse bei Variation der Temperatur und konstant gehaltenem Druck, die Gleichung der Änderung der freien Energie (Gl.5.4.b.) vereinfacht sich ebenfalls zu einem quadratischen Polynom (Gl.5.12.). Auch hier gilt die Gleichung der chemischen Verschiebung für ein Zweizustandsmodell gemäß Gl.5.6. Unter Verwendung des linearen Gliedes von Gl.5.10. sowie den Gl.5.6., Gl.5.8. und Gl.5.9. erhält man den Zusammenhang Gl.5.13. zwischen den Koeffizienten des quadratischen Polynoms zur Beschreibung des Verlaufs der chemischen Verschiebung und den temperaturabhängigen Größen der Gibbs'schen freien Enthalpie.

$$\Delta G = \Delta G_0(T_0, p_0) - \Delta S_0(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 \quad (\text{Gl.5.12.})$$

$$\delta = \delta_m + \delta_\Delta \left( \frac{-\Delta G}{2RT} \right) = \delta_m + \delta_\Delta \left( \frac{\Delta G_0(T_0, p_0) - \Delta S_0(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2}{2RT} \right) \quad (\text{Gl.5.13.})$$

In Gl.5.13. und Gl.5.11. sind für eine vollständige Beschreibung immer die chemischen Verschiebungen  $\delta_I$  und  $\delta_2$  in beiden Zuständen an den Enden des sigmoiden Kurvenverlaufs (Gl.5.6.) notwendig, um  $\delta_A = \delta_I - \delta_2$  und  $\delta_m = (\delta_I + \delta_2) / 2$  zu berechnen. Damit ist es auch durch die obige Umformung nicht möglich, quantitative Rückschlüsse aus den Koeffizienten der quadratischen Polynome z.B. auf die temperaturabhängige Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  oder die druckabhängige Volumenänderung  $\Delta V_0$  zu ziehen. Die obigen Ausführungen legen jedoch dar, dass die Polynome nicht nur eine Beschreibung des Kurvenverlaufs der chemischen Verschiebung erlauben, sondern auch einen thermodynamischen Hintergrund haben.

### 5.2.2. Aussagekraft der chemischen Verschiebung von $^{15}\text{N}$ , $^1\text{H}$ und $^{13}\text{C}$

Die chemische Verschiebung reagiert sehr sensitiv auf Abstand, Orientierung und Bindungszustände benachbarter Atome, bis heute gibt es jedoch kein vollständiges Verständnis der Ursachen, das fundierte quantitative Aussagen zulassen würde. In diesem Abschnitt der Arbeit wurden mittels  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -2D-HNCO Experimenten die chemischen Verschiebungen der Stickstoffatome der Amidbindungen, der Amidprotonen und der Kohlenstoffatome der Carbonylgruppen im Proteinerückgrat bestimmt. Eine Summenformel der verschiedenen Beiträge zur chemischen Verschiebung der Protonen ist bei Ösapay und Case (1991) zu finden (Gl.5.14.). Die lokalen diamagnetischen  $\delta_d$  und paramagnetischen  $\delta_p$  Effekte können den Werten der chemischen Verschiebungen kurzer ungefalteter Proteine gleichgesetzt werden, während die übrigen nicht lokalen Beiträge erst durch die Peptidsequenz und die Faltung des Proteins in Erscheinung treten. Diese Komponenten sind die Beiträge durch Ringströme  $\delta_{rc}$  aromatischer Seitenketten, magnetische Anisotropie  $\delta_m$ , elektrostatische Effekte  $\delta_{el}$  und Lösungsmittelleffekte  $\delta_s$ . Der am besten verstandene Einfluss auf die chemische Verschiebung stammt von den Ringströmen (Haigh & Mallion 1980), wobei jedoch die Korrelation der Ergebnisse für Seitenkettenprotonen höher ist als für  $\text{H}^{\text{N}}$  und  $\text{H}^{\alpha}$  (Ösapay und Case 1991).

$$\delta = \delta_d(\text{lokal}) + \delta_p(\text{lokal}) + \delta_{rc} + \delta_m + \delta_{el} + \delta_s \quad (\text{Gl.5.14.})$$

Die magnetische Anisotropie  $\delta_m$  der chemischen Verschiebungen von Protonen wird von Ösapay und Case (1991) durch Gl.5.15. beschrieben. Der Term  $\delta_m$  zeigt eine Abhängigkeit des betrachteten Protons vom Abstand  $R$  zu dieser Gruppe und dem Winkel  $\theta$  zwischen dem Verbindungsvektor des betrachteten Protons zur entfernten Gruppe und der Ebene der Peptidbindung.  $\Delta\chi = -5,1 \cdot 10^{-5} \text{ J T}^{-2} \text{ mol}^{-1}$  ist eine Konstante, die für Formamid bestimmt wurde,  $L_0$  ist die Avogadrokonstante. Soweit  $R$  bekannt ist, kann aus Gl.5.15. die chemische Verschiebung berechnet werden, in den meisten Fällen ist dies jedoch nicht der Fall. Gl.5.15. zeigt aber, dass Änderungen der chemischen Verschiebung mit einer Torsion des N-H oder C-H Bindungsvektors gegenüber der Lage entfernterer Gruppen erklärt werden können.

$$\delta_m = (3L_0 R^3)^{-1} \Delta\chi (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (\text{Gl.5.15.})$$

Die chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ -Amidprotonen sind nach allgemein akzeptierter Ansicht, z.B. Li et al. (1998), ein Maß für die Länge der Wasserstoffbrückenbindung, während die  $^{15}\text{N}$ -Verschiebungen an die dihedralen Winkel des Protein Rückgrates gekoppelt sind. Wie oben beschrieben, zeigen nach Ösapay & Case (1991) auch die Amidprotonen eine gewisse Winkelabhängigkeit. Nach Baxter et al. (1998) folgen die  $\text{H}^{\text{N}}$  Protonen einer  $r^{-3}$  Abhängigkeit vom Abstand zur nächsten Carbonylgruppe, die als Akzeptor für

Wasserstoffbrückenbindungen fungiert (Wagner et al. 1983). Generell kann festgestellt werden, dass eine Verkürzung der Amidprotonenbindungslänge in einer Tendenz der  $H^N$ -Verschiebungen zu niedrigerem Feld hin resultiert (Baxter et al. 1998).

Bei Variation der Temperatur kommt es im Allgemeinen zu starken Änderungen der chemischen Verschiebungen (Andersen et al. 1997). Liegen die temperaturinduzierten chemischen Verschiebungen oberhalb von  $-4,5 \text{ ppm K}^{-1}$ , so wird dies von Skalicky et al. (1994), Dyson et al. (1988) sowie Baxter & Williamson (1997) durch die Einbeziehung des Protons in eine Wasserstoffbrückenbindung erklärt. Die allgemeine Temperaturabhängigkeit beruht auf der Vergrößerung der Wasserstoffbrückenbindungsängen durch zunehmende Bewegung der Moleküle mit steigender Temperatur (Tilton et al. 1992), die Verlängerung der Bindung verlagert die  $H^N$  chemische Verschiebung zu niedrigeren ppm Werten (Asakura et al. 1995). Die Stärke des Temperatureffektes nimmt zu, wenn das Proton eine Brückenbindung mit Wasser eingeht. (Young et al. 1994).

Die thermischen Ausdehnungskoeffizienten von Proteinen sind weitgehend linear von der Temperatur abhängig (Tilton et al. 1992), was eine gute Erklärung für die meist linearen temperaturbedingten Änderungen der chemischen Verschiebungen liefert. Die Postulierung hoher Linearität muss nach Baxter et al. (1998), der einige Nichtlinearitäten bei Untersuchungen der Proteine *PGK*, *Lysozym* und *BPTI* entdeckte, und auch nach Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit, stark relativiert werden. Die Linearität ist nur innerhalb eines eng begrenzten Bereichs gegeben, vermutlich dem Bereich höchster Stabilität, darüber hinaus kommt es zu Denaturierung verbunden mit hoher Nichtlinearität. Die Ausdehnungskoeffizienten in wässriger Lösung liegen nach Heremans für Proteine bei  $40\text{-}110 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ , für Aminosäuren bei  $1000\text{-}1550 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$  und Wasser bei  $210 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ . Wie an den erstaunlich hohen Temperaturkoeffizienten reiner Aminosäuren und der geringeren Wärmeausdehnung von Proteinen gegenüber Wasser ersichtlich, muss die Ausdehnung stark durch Bildung von Wasserstoffbrücken gesteuert sein. Diese sind im wohlgefalteten Protein meist intramolekular ausgerichtet, was zu einer Stabilisierung des Proteins führt. Dies erklärt die lineare Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen im gefalteten Zustand und die Nichtlinearitäten im Bereich beginnender Denaturierung.

Auch durch Druckeinwirkung ändern sich N-H Bindungsängen und dihedrale Winkel, da hydrophobe Bereiche der Proteine durch Veränderung der physikalischen Eigenschaften des Wassers mit zunehmendem Druck hydratisiert werden (siehe oben). Teilweise sind auch druckabhängige nichtlineare Druckeffekte zu finden (Li & Akasaka 2001). Dies wird auch an den Ergebnissen dieser Arbeit sichtbar, wenngleich die Auswirkungen der Temperatur erheblich größer sind. Eindeutige Korrelationen druckinduzierter chemischer Verschiebungen zu Sekundärstrukturelementen, wie  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices, konnten bisher nicht gefunden werden (Li et al. 1998). Ähnlich den Ergebnissen von Young et al. (1994) wurde von Li et al. (1998) eine stärkere Druckabhängigkeit bei Amidprotonen gefunden, die Brückenbindungen zum Wasser eingehen, als bei jenen die in intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen integriert sind. In Anlehnung an die Resultate von Wagner et al. (1983), konnte Li et al. (1998) für die Amidprotonen, die Brückenbindungen zu Carbonylgruppen eingehen, eine Abstandsabhängigkeit (Gl.5.16.), der als „Formationsverschiebung“ bezeichneten chemischen Verschiebung  $\Delta\delta_f$ , am Protein BPTI ermitteln. Die weiteren in die Verschiebung eingehenden Komponenten, wie Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung im ungefalteten Zustand und Ringstromeffekte scheinen hier nur geringe Beiträge zu liefern.

$$\Delta\delta_f = 19,9d_N^{-3} - 2,3 \quad (\text{Gl.5.16.})$$



Erschwerend für die Entwicklung von Modellen zur Beschreibung der chemischen Verschiebungen der mit Wasser austauschenden Amidprotonen wirkt sich sowohl die Temperaturabhängigkeit (Bai et al. 1993), als auch die Druckabhängigkeit der Austauschraten (Kapitel 4) aus.

Die Ursache all dieser Einzeleffekte ist nur schwer zu separieren, daher ist es sinnvoll auch andere Kerne innerhalb des Proteinrückgrates zu untersuchen. Die Möglichkeiten sind hier jedoch aufgrund der geringen Probenmengen in den Hochdruckkapillaren beschränkt.

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC Spektren würden die Messung der chemischen Verschiebungen von  $\text{C}^\alpha$  und  $\text{C}^\beta$  Protonen ermöglichen, die aussagekräftige Winkelbeschränkungen der dihedralen Winkel  $\Phi$  und  $\Psi$  liefern würden (Beger & Bolton 1997, Wishart & Sykes 1994, Wishart et al. 1992). Aufgrund zu langer Messzeiten sind diese Experimente nur in ihrer 2D-Variante möglich, was zu einer zu starken Signalüberlappung führt, sodass insbesondere die  $\text{H}^\alpha$ -Protonen nicht mehr zu identifizieren sind.

Auch die  $^{13}\text{C}$  Atome der Carbonylgruppe befinden sich im Proteinrückgrat. Diese können mittels eines 2D-HNCO-Experiments an  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  editiertem Protein vermessen werden, und liefern gut aufgelöste Spektren bei wenig Überlappungen der Signale. Die Carbonyl-Kohlenstoffatome haben eine hohe Bedeutung für die Interpretation der Daten der Amidprotonen, da sie mit diesen Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können, ohne durch Austausch mit umgebendem Wasser einem zusätzlichen Einfluss zu unterliegen. Die HNCO-Daten können damit eine gewisse Redundanz bei der Interpretation der gemessenen Daten liefern.

### 5.3. Materialien und Methoden

#### 5.3.1. Expression und Aufreinigung von *TmCsp*

Die Expression und Aufreinigung des nicht isotopenmarkierten Proteins erfolgte gemäß der Beschreibung von Welker (1999) durch die Arbeitsgruppe Jaenicke der Universität Regensburg. Zur Expression von  $^{15}\text{N}$  angereichertem Protein wird das Plasmid mit der Sequenz für *TmCsp* in *E. Coli* BL21 (DE3) Zellen transformiert. Nach einer Wachstumsphase von maximal 12 Stunden bei 37 °C in M9 Minimal Medium das 0,5 g/l  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  und 1 g/l Glucose enthält, werden die Zellen mit 1mM IPTG angeimpft, um das weitere Wachstum zu hemmen und die Überexpression des Proteins *TmCsp* über 16 Stunden zu induzieren. Da *TmCsp* aus einem hyperthermophilen Organismus stammt, kann die Aufreinigung mit einer Hitzefällung bei 65 °C über 30 min beginnen, anschließend wird zentrifugiert und der Überstand mit 70 % Ammoniumsulfat ausgefällt, wobei *TmCsp* weiter in der Lösung verbleibt. Für die letzte Stufe der Aufreinigung wird die hydrophobe RNA-Bindestelle von *TmCsp* ausgenutzt. Dazu wird die verbliebene Lösung auf eine Phenyl-Sepharose-Säule zur Reinigung durch hydrophobe Interaktionschromatographie gegeben.

#### 5.3.2. Zusammensetzung der NMR-Proben

Die NMR-Proben, sowohl von  $^{15}\text{N}$  markiertem als auch nicht markiertem *TmCsp*, enthielten 2 mM Protein, in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,5), 20 mM NaCl, 0,2 mM Na-EDTA, 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{NaN}_3$ , 10%  $\text{D}_2\text{O}$  und 90%  $\text{H}_2\text{O}$ . Die pH-Messung erfolgte mit einer Glaselektrode (761 Calimatic von Fa. Knick).

Für die Messungen in Tris/HCl Puffer wurde eine Probe obiger Zusammensetzung mit einer Gelfiltrationssäule PD10 bei einem Vorlauf von 25 ml 5 mM Tris/HCl Puffer und 4 mM NaCl auf Tris umgepuffert. Im Anschluss wurden die Proben gefriergetrocknet und mit 50 mM Tris/HCl Puffer und NaCl 90 %  $\text{H}_2\text{O}$  und 10%  $\text{D}_2\text{O}$  aufgefüllt. Mangels Protein betrug die Konzentration nur etwa 1,5 mM. Die mit Tris/HCl Puffer vermessenen Druck- und Temperaturstufen zeigt Tab.5.2.

#### 5.3.3. NMR-Messtechnik

Die Messungen an *TmCsp* wurden ausschließlich am Bruker DRX 600 MHz Spektrometer durchgeführt und erfolgten mit einem 8 mm Tripelresonanzkopf. Saphirzellen standen zum Zeitpunkt der Messungen noch nicht zur Verfügung, sodass nur 5 mm Glaskapillaren verwendet wurden. Die Drift des Hauptmagneten wurde durch Nachführung des Feldes auf das Locksignal des in der Probe enthaltenen  $\text{D}_2\text{O}$  kompensiert.

Zur Messung der chemischen Verschiebungen der langsam austauschenden Amidprotonen und der aromatischen Seitenkettenprotonen in Abhängigkeit von Druck und Temperatur wurden  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren aufgenommen, die Messpunkte zeigt Tab.5.2. Bei 333 K und Drücken von 0,1-200 MPa wurde zusätzlich die  $J^{\text{HN}}$ -Kopplung durch Entfernen des  $^{15}\text{N}$ -Entkopplungspulses aus der HSQC-Pulssequenz vermessen.

Da die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen durch die Stärke von Wasserstoffbrücken beeinflusst werden, wurden zusätzlich noch bei verschiedenen Punkten die  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen der  $\text{C}'$  Kohlenstoffatome im Proteinrückgrat mit 2D-HNCO-Spektren vermessen. Hier ist kein störender Einfluß durch Austausch möglich. Die mit HNCO-Spektren vermessenen  $p$  und  $T$  Stufen sind in Tab.5.2. vermerkt.

Die chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ -Signale wurden direkt auf DSS referenziert, die  $^{15}\text{N}$ -Signale in der zweiten Dimension der Spektren wurden unter Verwendung des Verhältnisses

der  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Resonanzfrequenzen indirekt auf DSS referenziert (Wishart 1995b). Da in den HSQC-Spektren das DSS-Signal nicht zu sehen ist, wurde zur Kalibrierung grundsätzlich vor jeder Aufnahme eines HSQC Spektrums ein  $^1\text{H}$ -1D-Spektrum aufgenommen. Zur Unterdrückung des Wassersignals wurde mit einem 1 s dauernden Puls niedriger Intensität vorgesättigt.

Anzahl	0,000 MPa	0,025 MPa	0,050 MPa	0,075 MPa	0,100 MPa	0,125 MPa	0,150 MPa	0,175 MPa	0,200 MPa	Summe
<b>HSQC / Phosphatpuffer</b>										
255 K									1	
259 K									1	
263 K									1	
271 K									1	
276 K	1		1		1		1		1	
279 K									1	
282 K	1		1		1		1		1	
287 K									1	
292 K	1		1		1		1		1	
295 K									1	
303 K	2	1	2	1	4	1	2	1	5	
311 K	1		1		2		1		2	
320 K	1		1		2		1		2	
328 K			1		1		1		1	
330 K	1				2				2	
338 K			1		1		1		1	
339 K	1				1			1		71
<b>HSQC / Tris/HCl-Puffer</b>										
303 K	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
<b>HNCO / Phosphatpuffer</b>										
258 K									1	
263 K									1	
268 K									1	
273 K									1	
283 K									1	
293 K									1	
303 K	1		1		1		1		1	
333 K	1		1		1		1		1	16
<b>HSQC nicht entkoppelt / Phosphatpuffer</b>										
333 K	1		1		1		3		1	7
										103

Tab.5.2. Die Übersichtstabelle zeigt die Druck und Temperaturstufen zu denen HSQC- oder HNCO-Spektren aufgenommen wurden und welche Puffer verwendet wurden. Es ist jeweils die Anzahl der vermessenen und zugewiesenen Spektren aufgetragen.

#### 5.3.4. Einstellung von Druck und Temperatur

Eine manuell bediente Spindelpresse nach den Beschreibungen in Kapitel 2 diente zur Druckeinstellung. Gemessen wurde der Druck mit Hilfe eines Bourdon-Manometers der Genauigkeitsklasse 0,1 ( $\pm 0,6$  MPa). Die Pausen zwischen den Messungen waren ausreichend bemessen, um einen Temperatúrausgleich bei Kompression oder Dekompression zu gewährleisten.

Bei Temperaturen unterhalb von 276 K wurden mit einem Flüssigstickstoff-Verdampfungssystem gekühlt, darüberliegende Werte wurden mit der Temperiereinheit

Eurotherm BVT 2000 des DRX 600 Spektrometers eingestellt. Der Luftdurchsatz war bei allen Messungen konstant 270 l/min.

Da die Schutzhüllen und die Wandstärke der Hochdruckkapillaren den Wärmeübergang zwischen Heizluftstrom und Probe behindern, wurde für die verwendeten Hochdruckkapillaren eine Kalibrierung der Temperatur nach den Angaben von Raiford (1979) durchgeführt. Im Bereich von 250 K bis 320 K ergibt sich die Proben temperatur aus Gl.5.17. über den Abstand der chemischen Verschiebung  $\Delta\delta$  der Hydroxyl- und Methyllinien von Methanol, für den Bereich von 300 K bis 370 K ist Gl.5.18. zu verwenden. Hier ist  $\Delta\delta$  der Abstand der Methylen- und Hydroxylsignale von Ethylenglycol. Die Proben befanden sich jeweils in einem identischen Aufbau wie *TmCsp* Lösung bei Hochdruckmessungen.

$$T(K) = 403,0 - 29,53 \cdot \Delta\delta - 23,87 \cdot (\Delta\delta)^2 \quad (\text{Gl. 5.17.})$$

$$T(K) = 466,0 - 101,6\Delta\delta \quad (\text{Gl. 5.18.})$$

Die Auflösung der  $^1\text{H}$ -1D-Spektren betrug in der Regel 16 kByte, mit 128 Einzelmessungen, bei etwa 5 min Messzeit. Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren wurden mit 2048 Messpunkten und 32 Einzelmessungen in der direkten Dimension ( $\omega_2$ ) und 256 Zeilen in der indirekten Dimension ( $\omega_1$ ) bei einer Messzeit von 2,5 Stunden aufgezeichnet. Zur Verbesserung der Auflösung in der indirekten Dimension wurde der Datenbereich auf 512 Zeilen durch lineare Vorhersage erweitert.

### 5.3.5. Auswertung der Daten

Die spektrale Auswertung, Phasierung und Korrektur der Basislinie erfolgten mit dem Programm XWIN-NMR 2.6 von Bruker.

Zur Benennung der Signale wurde das Programm AUREMOL (Ganslmeier et al. in Vorbereitung) verwendet. Grundlage der Benennung ist ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum, dessen Signale von Kremer et al. (2001) bei Normaldruck und 303 K den einzelnen Aminosäuren von *TmCsp* zugeordnet worden waren. Unter der Annahme einer stetigen Änderung der chemischen Verschiebung, bei moderater Variation von Druck und Temperatur, konnten die Signale, durch Vergleich von Spektren bei ähnlichen Umgebungsbedingungen, eindeutig bestimmten Aminosäuren zugeordnet werden.

Die endgültige Datenauswertung zur Berechnung der Koeffizienten von linearer (Gl.4.2.) und quadratischer (Gl.5.8., Gl.5.12.) Regression erfolgte mit dem Programm EXCEL (Microsoft) und ORIGIN 6.0 (Microcal). In den folgenden Abschnitten wurde für alle Korrelationen zwischen zwei verschiedenen Datensätzen  $X$  und  $Y$ , bestehend aus  $n$  Datenpunkten, der Pearsonsche Korrelationskoeffizient  $r$  nach Gl.5.19. verwendet. Die Formel (Gl.5.19.) ist in EXCEL implementiert und der zugehörigen Programmdokumentation entnommen. Pearsonsche Korrelationen zwischen verschiedenen Daten des Proteins *HPr* sind in der Arbeit von Kalbitzer et al. (2000) zu finden und werden zur Abschätzung linearer Zusammenhänge zwischen verschiedenen Datensätzen angewendet.

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n\sum X^2 - (\sum X)^2][n\sum Y^2 - (\sum Y)^2]}} \quad (\text{Gl.5.19.})$$

## 5.4. Ergebnisse und Diskussion

### 5.4.1. Einfluss des Puffersystems

Wie bei den Tetrapeptiden muss zunächst der Einfluss des Puffers auf die chemischen Verschiebungen von *TmCsp* abgegrenzt werden. Da Messungen in einem weiten Temperaturbereich von 255 K - 348 K durchgeführt wurden, war es sinnvoll Phosphatpuffer, mit seinem geringeren Temperaturkoeffizienten des pH von  $\Delta_{\text{pH}} = 0,0028 \text{ K}^{-1}$ , gegenüber Tris/HCl Puffer mit  $\delta_{\text{pH}} = 0,028 \text{ K}^{-1}$  (Rehm 2000), zu bevorzugen. Nachteilig für Phosphatpuffer ist die druckinduzierte Änderung des pH von  $\Delta_{\text{pH}} = -4,4 \text{ GPa}^{-1}$  (Neumann 1973, Hitchens 1997, Kitamura 1985). Wie in Kapitel 4 gezeigt wurde, ist dies jedoch nur dann von Bedeutung, wenn der  $\text{pK}_a$  der Amidgruppen des Proteinerückgrates oder einer ionisierbaren Seitenkette in der Nähe des zu vermessenden pH liegt. Die hier verwendete Phosphatpufferlösung wurde auf einen pH von 6,5 eingestellt. Dieser Wert ist weit genug von den  $\text{pK}_a$  Werten, der in Tab.4.5. genannten Aminosäuren mit ionisierbaren Seitenketten, entfernt. Als einzige Ausnahme bleibt Histidin, dass an Position 28 und 61 in der Aminosäuresequenz von *TmCsp* auftritt.

Um eine Abschätzung des Verhaltens in beiden Puffersystemen vornehmen zu können, wurden zwei Druckmessreihen in Tris/HCl- und Phosphatpuffer bei einer Temperatur von 303 K durchgeführt. Die Erhöhung des Druckes in Schritten von 25 MPa, von Normaldruck bis 200 MPa, garantiert hohe Verlässlichkeit der Daten. Die Auswertung erfolgte, wie in Kapitel 4 beschrieben, mit einer linearen Näherung der chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ -Amidprotonen, sowie der Resonanzen der aromatischen Seitenkettenprotonen, die in den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren zu identifizieren waren. Zusätzlich kommen noch die  $^{15}\text{N}$ -Verschiebungen hinzu, die ebenfalls linear approximiert wurden. Die Ergebnisse sind vollständig in Tab.10.5. und Tab.10.6. aufgelistet.

Wie aus Abb.5.6. zu ersehen, sind nahezu keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messreihen der druckabhängigen chemischen Verschiebungen in Tris/HCl-Puffer und Phosphatpuffer feststellbar. Die linearen Koeffizienten  $\delta_1$  der Regressionsgeraden der Druckreihen der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren korrelieren mit 0,98 für die  $^{15}\text{N}$ -Resonanzen und 0,99 für die  $^1\text{H}$ -Resonanzen in beiden Puffersystemen.

Bei Betrachtung der Seitenkettenresonanzen, soweit diese in den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren zu beobachten sind (Abb.5.7.), ist ebenfalls kein unterschiedliches Verhalten außerhalb der Fehlergrenzen in beiden Puffersystemen festzustellen. Eine Ausnahme bilden das im fünften  $\beta$ -Strang befindliche Histidin 61 und Lysin 38, deren  $^1\text{H}$ -Resonanz zwischen beiden Puffern unterschiedliches Druckverhalten zeigt. Das Verhalten von Histidin ist, wie aus Kapitel 4 bereits bekannt, auf den  $\text{pK}_a$  der Histidinseitenketten von etwa 7,0 und die Druckabhängigkeit des pH von Phosphatpufferlösungen zurückzuführen. Dementsprechend ist im Phosphatpuffer ein höherer Gradient der chemischen Verschiebung bei Variation des Drucks zu verzeichnen.

Die Auswirkung des Puffers macht sich für Histidin 61 auch in Unterschieden der chemischen Verschiebung bei Normaldruck bemerkbar. Zur Darstellung dieser Werte wurde die Differenz der konstanten Koeffizienten  $\delta_0 = \delta_0(\text{Tris}) - \delta_0(\text{Phos.})$  der linearen Regressionsanalyse der Druckreihen in Tris/HCl- und Phosphatpuffer gebildet und in Abb.5.9. dargestellt. Die konstanten Koeffizienten  $\delta_0$  entsprechen den chemischen Verschiebungen bei Normaldruck mit hinreichender Genauigkeit.

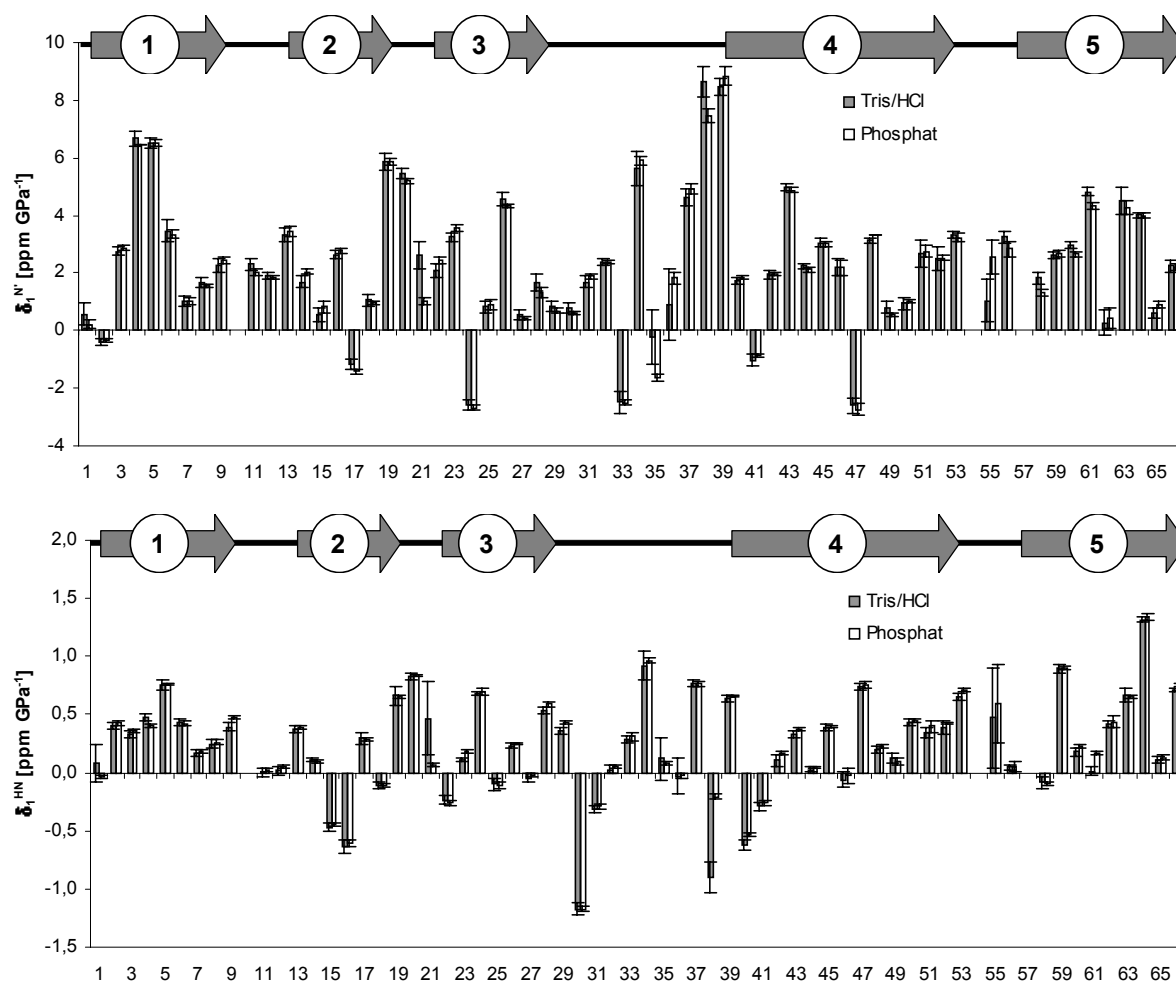


Abb.5.6. Die linearen Koeffizienten der Regressionsanalyse der Resonanzen von  $^{15}\text{N}'$  (oben) und  $\text{H}^{\text{N}}$  (unten) im *TmCsp* Proteinrückgrat sind in Tris/HCl- und Phosphatpuffer bei Variation des Drucks von 0,1 MPa bis 200 MPa innerhalb der Fehlergrenzen gleich. Ausnahmen sind die Aminosäuren K38 und H61. Die Proben temperatur betrug 303 K.

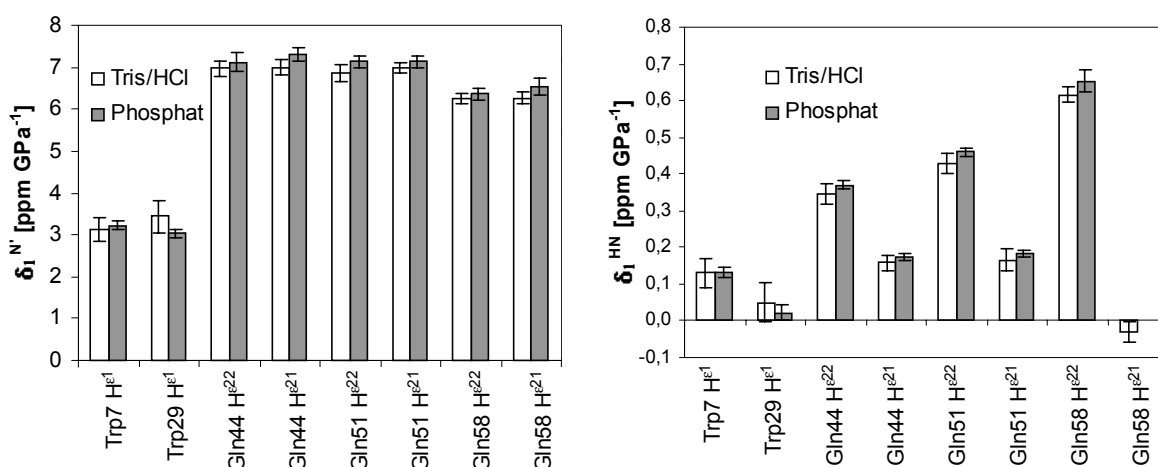


Abb.5.7. Die linearen Koeffizienten der Druckabhängigkeit der beobachtbaren  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Signale der Seitenketten von *TmCsp* sind in Tris/HCl- und Phosphatpuffer bei Variation des Drucks von 0,1 MPa bis 200 MPa innerhalb der Fehlergrenzen gleich. (Proben temperatur 303 K)

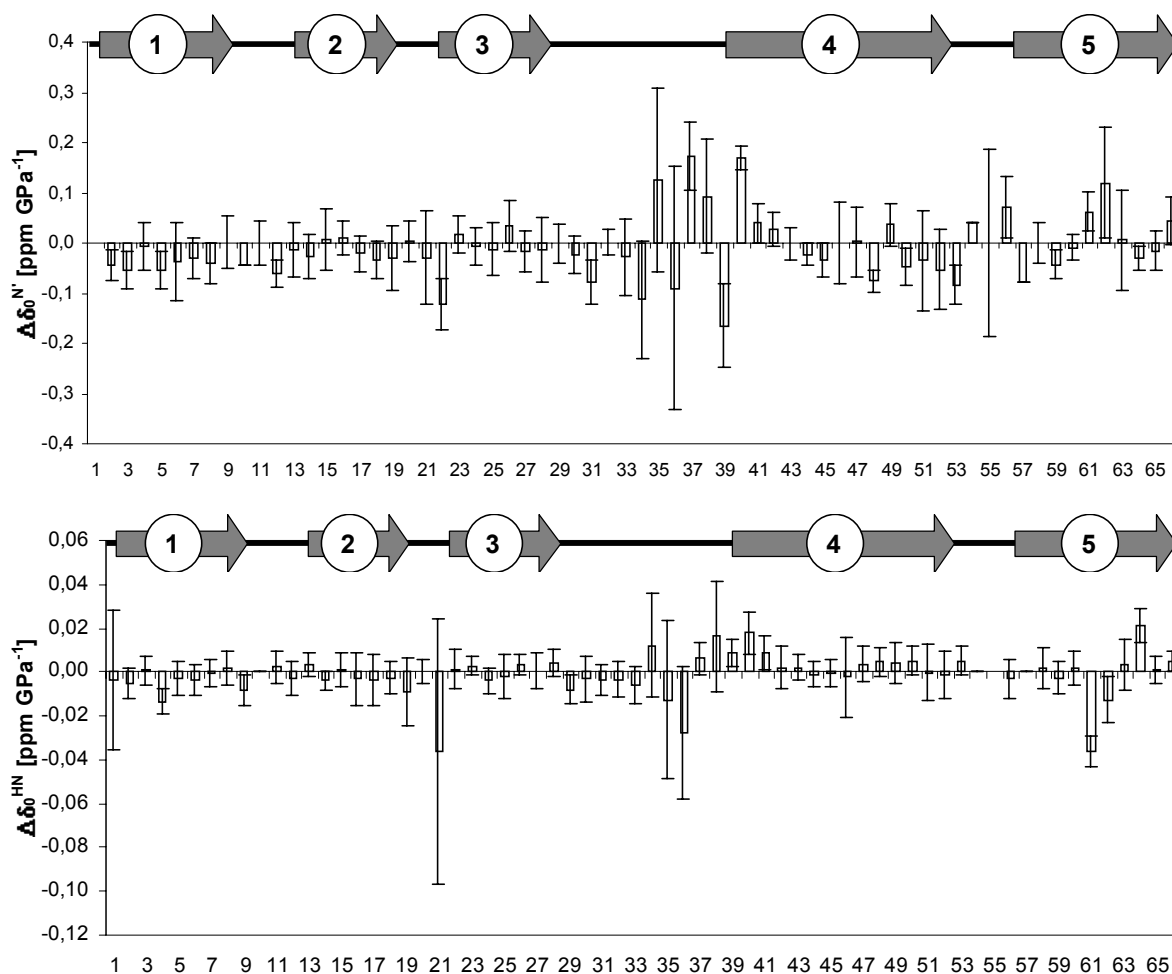


Abb.5.8. Die Differenz der konstanten Koeffizienten  $\delta_0$  der linearen Regressionsanalyse der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta_0 = \delta_0(\text{Tris.}) - \delta_0(\text{Phos.})$  von *TmCsp* in Tris/HCl- und Phosphatpuffer zeigt, mit wenigen Ausnahmen, bei den <sup>15</sup>N- und <sup>1</sup>H-Resonanzen keine signifikante Änderungen. (Probentemperatur 303 K).

Histidin 61 gehört zu den wenig konservierten Aminosäuren der Familie der Kälteschockproteine und scheint somit nicht für die Funktion des Proteins in der lebenden Zelle von entscheidender Bedeutung zu sein. Im Gegensatz dazu gehört Histidin 28 zu den hochkonservierten Aminosäuren der Kälteschockproteine und wird der funktionalen Gruppe zur mRNA Bindung in *TmCsp* (Welker 1999) zugeordnet. Seiner funktionalen Bedeutung entsprechend scheinen Mechanismen zu existieren, die H28 gegenüber H61 wirkungsvoll gegen Variationen des pH stabilisieren, zumindest zeigen sich hier weder in der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen, noch in den konstanten Parametern  $\delta_0$  der linearen Regressionsanalyse, Abweichungen im Verhalten in Tris/HCl- und Phosphatpuffer.

Die pH-Stabilisierung des H28 könnte durch die Ausrichtung des Imidazolrings in eine hydrophobe Kavität hinein bedingt sein. Die *TmCsp* Strukturdaten von Kremer et al.(2001) zeigen jedoch, dass die Seitenketten (Abb.5.9.), sowohl von H28 als auch von H61 nach Außen gerichtet sind. Kremer et al. (2001) ermittelten für die meisten Aminosäuren in *TmCsp* sehr geringe Austauschraten mit Wasser, dies ist durch eine sehr feste Einbindung der Aminosäuren in die  $\beta$ -Stränge zu begründen. Einzig die Aminosäuren R2, F8, H61 und E66 in den Faltblättern, sowie S10-K12, D20- D24 S30, A31, E33-L40, E42, G43, I50 und E52-

P57 zeigten starken Austausch. Das unterschiedliche Verhalten von H28 und H61 ist damit durch die verschieden starke Einbindung in die Faltblattstruktur zu begründen.

Auch K38 zeigt in beiden Puffern unterschiedliches Verhalten. Der Seitenketten  $pK_a$ -Wert liegt um 11,0 (Tab.4.5.) und damit weit genug vom hier verwendeten pH von 6,5 entfernt. Wie Abb.5.9. zeigt, ist K38 auch sterisch nicht in der Nähe von His 61 und His 28, sodass auch dies keine Begründung für das Verhalten ist. Eine mögliche, aber mit den hier vermessenen Daten nicht belegbare Erklärung, ist die Aggregation von *TmCsp* mit Phosphat oder Tris/HCl-Puffer. Die Druckabhängigkeiten der Signalvolumina in beiden Puffersystemen verhalten sich identisch. Allerdings ist das Signal in Tris/HCl-Puffer aufgrund geringerer Probenkonzentration (Tris 1,5 mM / Phosphat 2 mM) schlecht aufgelöst, wobei das Signal von K38 durch den starken Austausch aufgrund der Lage in einer Schleifenregion ohnehin schon sehr stark verbreitert ist.

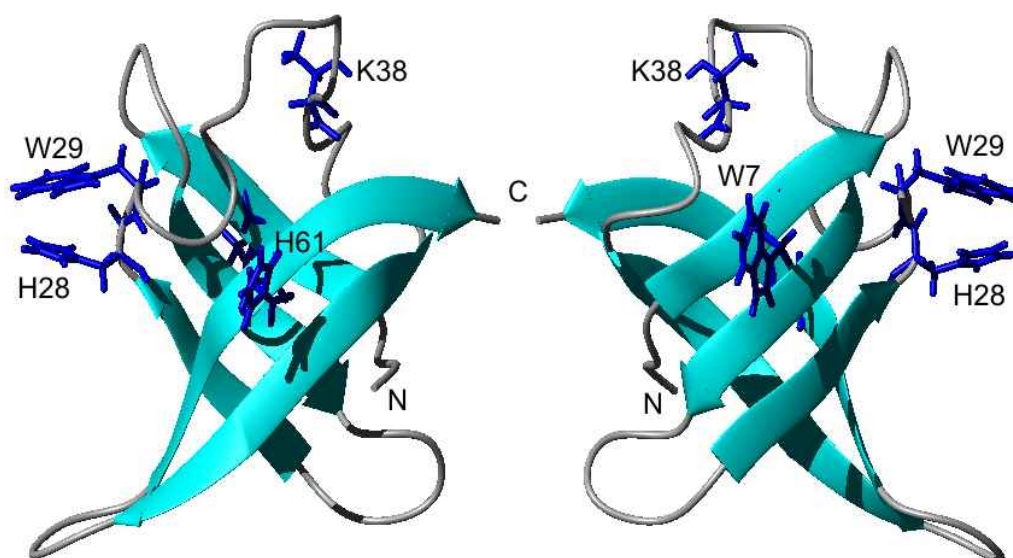


Abb.5.9. Die beiden Aminosäuren H61 und K38 zeigen Unterschiede im Druckverhalten in Tris/HCl- und Phosphatpuffer. H28 verhält sich dagegen in beiden Puffern gleich, obwohl die Seitenkette wie in H61 nach Außen gerichtet ist. Die drei Aminosäuren sind weit voneinander entfernt, das Verhalten kann damit nicht durch gegenseitige Beeinflussung zustande kommen.

In den Differenzen der konstanten Parameter  $\delta_0$  der linearen Regressionsanalyse der Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen sind, außer bei H61, nennenswerte Unterschiede oberhalb der Fehlergrenzen für die  $^{15}\text{N}$ -Resonanzen der Aminosäuren S30, E33, K38, T39, und A60, sowie die  $^1\text{H}$ -Resonanzen der Aminosäuren K4, L40 und V64 zu finden. Diese sind bis auf V64 und K4 den Aminosäuren mit schwacher Fixierung zur Sekundärstruktur zuzuordnen. Da keine dieser Aminosäuren signifikante Unterschiede im Druckverhalten in Tris/HCl- und Phosphatpuffer aufweist, kann die Ursache der unterschiedlichen chemischen Verschiebung nicht pH bedingt sein, da eine Druckvariation in Phosphatpuffer immer mit einer Verschiebung des pH verbunden ist. Auch wären die  $pK_a$ -Werte der ionisierbaren Seitenketten der Aminosäuren E33 und K4 zu weit vom hier verwendeten pH = 6,5 entfernt.

Effekte durch Bildung eines Aggregats aus Protein und Puffer können auch ausgeschlossen werden, da sich diese unter Druck verändern würden (Silva et al. 2001, Lüdemann 1988).

Eine abweichende Temperatureinstellung der beiden Messungen kommt auch nicht in Betracht, da sonst systematische Abweichungen für alle Aminosäuren zu beobachten wären. Damit verbleibt die Möglichkeit einer nicht näher zu bestimmenden Wechselwirkung zwischen Puffer und Protein, oder der Proteine untereinander, da die Messreihe in Tris/HCl-



Puffer bei einer geringeren Konzentration von 1,5 mM, gegenüber 2 mM in Phosphatpuffer, stattfand. Eine eher unwahrscheinliche Erklärung ist die unterschiedliche Faltung der Proteine beider Messreihen, die nicht aus dem gleichen Ansatz zur Expression stammten.

#### 5.4.2. Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen

Im Folgenden werden die Daten der Druckmessreihe von 0,1 MPa bis 200 MPa bei 303 K vorgestellt. Die quadratischen ( $\delta_2$ ) und linearen ( $\delta_1$ ) Koeffizienten der Druckabhängigkeit der  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ - Signale sind in Abb.5.11/12/13. als Balkendiagramm dargestellt. Die konstanten Koeffizienten  $\delta_0$  wurden vermindert um die mittleren Werte der chemischen Verschiebung ungefalteter Proteine (Random Coil) bei Normaldruck aus der Datenbank „BioMagResBank“ (BMRB) aufgetragen ( $\Delta\delta_0 = \delta_0 - \delta_{\text{RC}}$ ). Die Werte  $\Delta\delta_0$  stellen die aus der Faltung des Proteins resultierende Abweichung von den Werten ungefalteter Proteine (random-coil-Werte) dar, diese Werte sind ebenfalls in den Graphen Abb.5.11/12/13. enthalten. Die Koeffizienten aller beobachteten Daten sind den Tab.10.8/9/10/11/12. im Anhang zu finden. Zur Veranschaulichung des Druckverhaltens sind in Abb.5.10. die Daten der Druckmessreihe mit den Graphen der quadratischen Näherungen der  $^1\text{H}$ -Signale eingezeichnet.

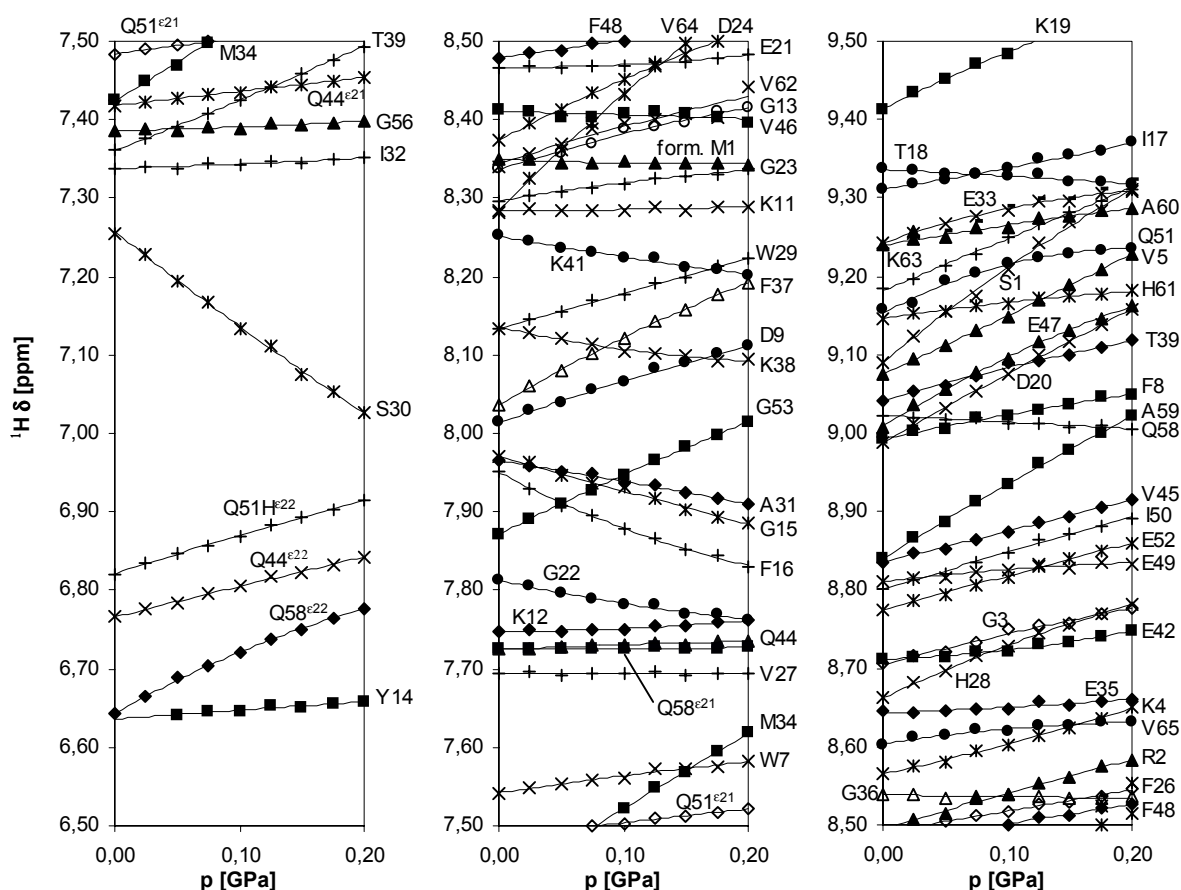


Abb.5.10. Die chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ -Signale und der beobachtbaren  $^1\text{H}$ -Signale der Seitenketten von *TmCsp* in Abhängigkeit des Druckes bei 303 K sind weitgehend linear. Eingezeichnet sind die quadratischen Polynome zur Näherung der Daten der chemischen Verschiebung.

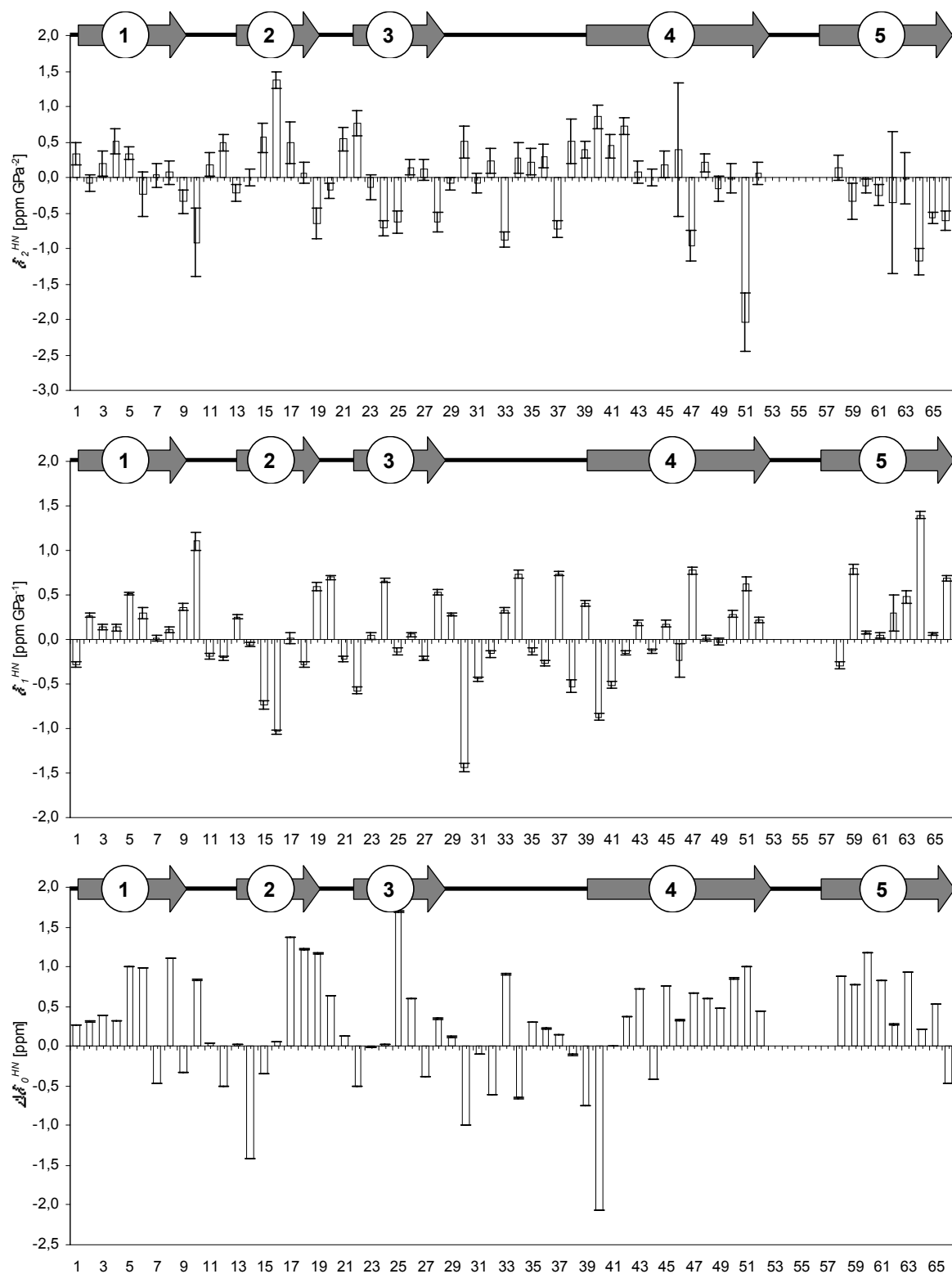


Abb.5.11. Druckverhalten der  $^1\text{H}$ -Signale von 0,1-200 MPa bei 303 K in *TmCsp*. Von oben nach unten sind die quadratischen ( $\delta_2$ ) und linearen ( $\delta_1$ ) Regressionskoeffizienten, sowie die Abweichung ( $\Delta\delta_0 = \delta_0 - \delta_{RC}$ ) der konstanten Koeffizienten ( $\delta_0$ ) der chemischen Verschiebung ungefalteter Proteine ( $\delta_{RC}$ ) gegen die Aminosäuresequenz dargestellt.

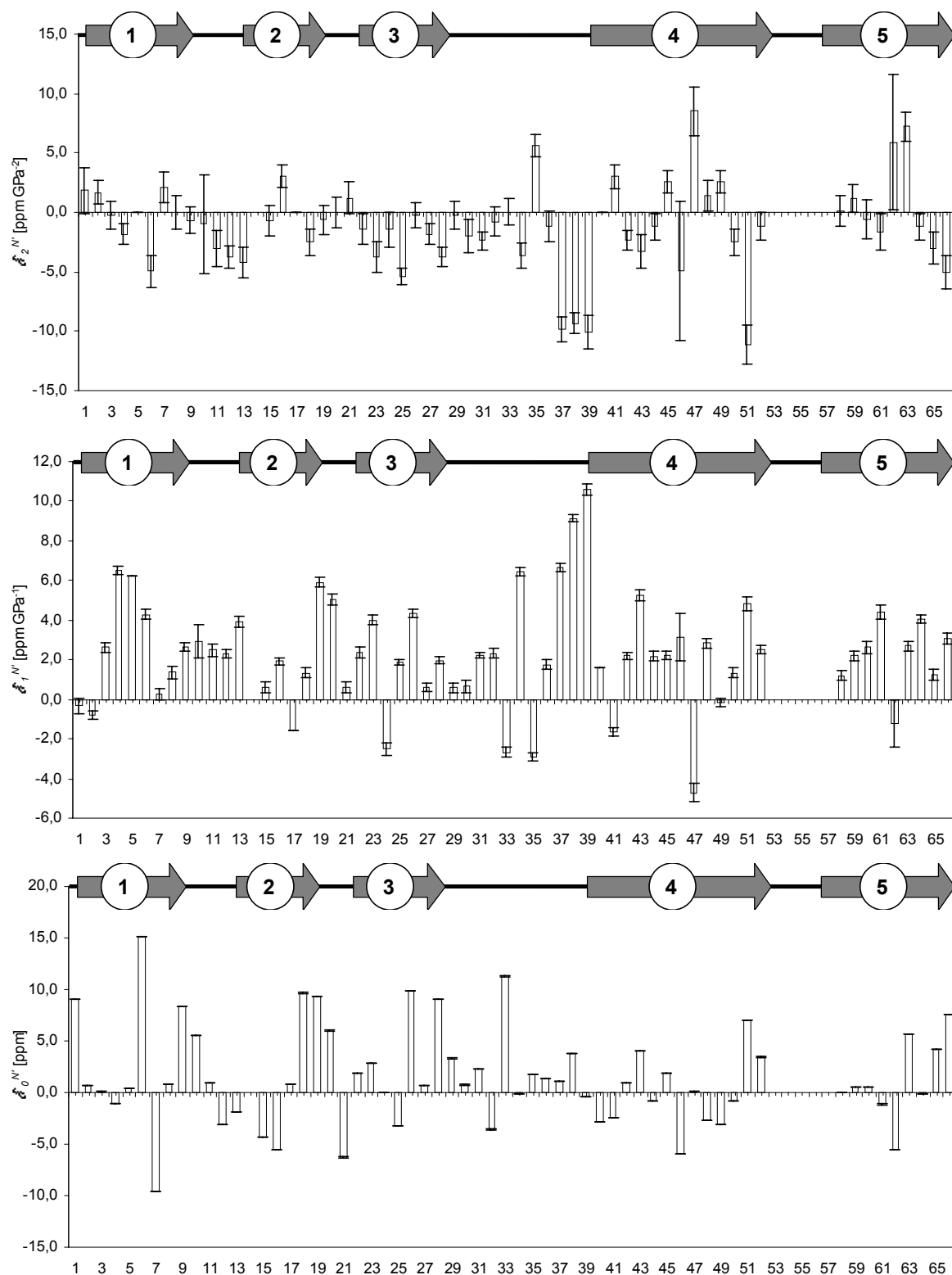


Abb.5.12. Druckverhalten der  $^{15}\text{N}'$ -Signale von 0,1-200 MPa bei 303 K in *TmCsp*. Von oben nach unten sind die quadratischen ( $\delta_2'$ ) und linearen ( $\delta_1'$ ) Regressionskoeffizienten, sowie die Abweichung ( $\Delta\delta_0 = \delta_0 - \delta_{\text{RC}}$ ) der konstanten Koeffizienten ( $\delta_0$ ) von der chemischen Verschiebung ungefalteter Proteine ( $\delta_{\text{RC}}$ ) gegen die Aminosäuresequenz dargestellt.

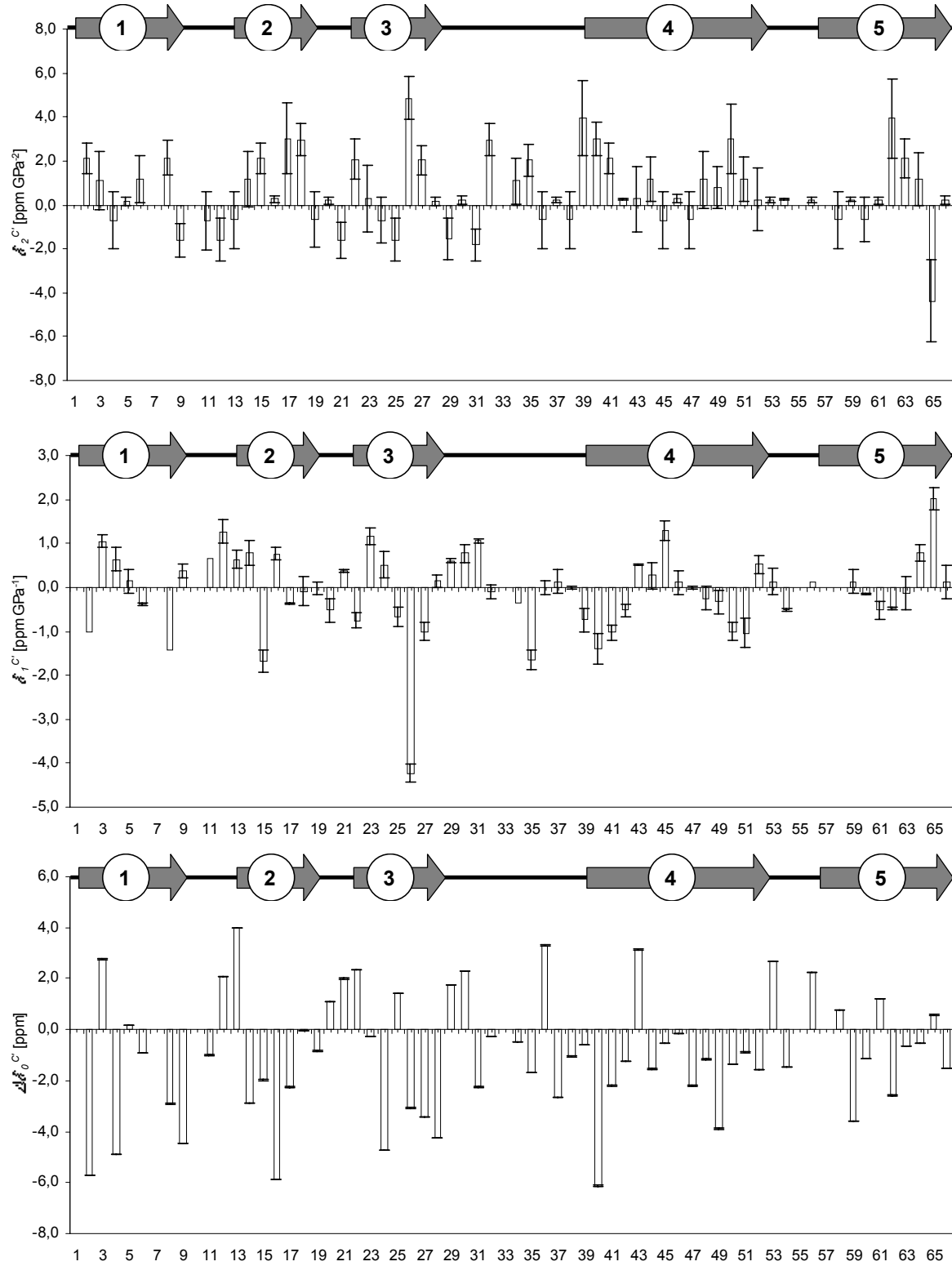


Abb.5.13. Druckverhalten der  $^{13}\text{C}'$ -Signale von 0,1-200 MPa bei 303 K in *TmCsp*. Von oben nach unten sind die quadratischen ( $\delta_2$ ) und linearen ( $\delta_1$ ) Regressionskoeffizienten, sowie die Abweichung ( $\Delta\delta_0 = \delta_0 - \delta_{\text{RC}}$ ) der konstanten Koeffizienten ( $\delta_0$ ) von der chemischen Verschiebung ungefalteter Proteine ( $\delta_{\text{RC}}$ ) gegen die Aminosäuresequenz dargestellt.

Das Druckverhalten der  $H^N$ -Resonanzen der Aminosäuren in *TmCsp* ist innerhalb des Druckbereichs von Normaldruck bis 200 MPa und einer Temperatur von 303 K weitgehend linear, wie schon an den  $H^N$ -Signalen in Abb.5.10. zu erkennen war. Es lässt sich auch kein auffallender Zusammenhang zur Sekundärstruktur des Proteins aus Abb.5.11. erkennen

Die linearen Änderungen der chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit des Drucks werden von Akasaka & Li (2001) als ein Indiz für lineare Änderungen der gemittelten Torsionswinkel und interatomaren Abstände angesehen. Als Folge dieser Interpretation wird für Gl.5.8. vermutet, dass die druckabhängige Kompressibilität  $\beta$  bei Variation des Drucks zu Null wird. Der Zusammenhang zwischen den Koeffizienten der quadratischen Näherung der Druckabhängigkeit und den druckabhängigen Termen der Gibbs'schen freien Enthalpie wurde im einführenden Abschnitt dieses Kapitels bereits gezeigt.

Während lineares Druckverhalten als eine Verschiebung des Gleichgewichtes zweier Konformere interpretiert wird, werden Nichtlinearitäten mit der Existenz weiterer Konformationen der Proteinfaltung in Zusammenhang gebracht. Diese zusätzlichen Konformere werden von Akasaka & Li (2001) und Baxter et al. (1998) als „low lying excited states“ bezeichnet, da die zum Übergang notwendige Energie sich in der Größenordnung weniger kcal / mol bewegt.

Zur Veranschaulichung der geschilderten Sachverhalte zeigt Abb.5.14. eine farbliche Darstellung der linearen und quadratischen Koeffizienten der  $H^N$ -,  $^{15}N^c$ - und  $^{13}C^c$ -Signale des Proteinrückgrates. Negative Werte sind blau dargestellt, positive rot. Die Grundstruktur der Darstellungen beruht auf den Daten von *TmCsp* bei 303 K und Normaldruck, die von Kremer et al.(2001) bestimmt wurden.

Abb.5.14. zeigt für die  $H^N$ -Koeffizienten besonders große Änderungen im Bereich der großen Schleife zwischen den  $\beta$ -Strängen 3 und 4, die in der Mitte im oberen Bereich der Darstellungen von *TmCsp* zu finden ist. Die starken Änderungen verdeutlichen die hohe Beweglichkeit dieser Region. Auffallend ist, dass das Vorzeichen der linearen Koeffizienten an vielen Stellen des Proteinrückgrates genau umgekehrt zu dem Vorzeichen der quadratischen Koeffizienten ist.

Mehr Nichtlinearitäten sind bei den  $^{15}N^c$ -Signalen zu finden, auffallend ist hier die Gruppe der drei Aminosäuren F37, K38 und T39, die am Ende der längsten Schleifen am Übergang zum  $\beta$ -Strang 4 zu finden sind. Nach Li et al. (1998) sind die  $^{15}N^c$ -Resonanzen ein Maß für die Diederwinkel im Proteinrückgrat. Das Auftreten von Torsionen am Übergang von der beweglichen Schleife zum rigiden Faltblatt bei Änderung des Drucks erscheint nicht unwahrscheinlich.

Die linearen Koeffizienten der  $^{13}C^c$ -Resonanzen schließlich zeigen zu beiden Enden des  $\beta$ -Strangs 4 einen Abfall zu negativen Werten mit einem Maximum in der Mitte. Insgesamt scheinen die linearen  $^{13}C^c$ -Koeffizienten der druckinduzierten Änderungen über die ganze *TmCsp* Sequenz sinusförmig moduliert zu sein. Dies könnte ein Hinweis auf die Mechanismen sein, die zur hohen Temperaturstabilität von *TmCsp* führen. Durch die Sequenz kompensieren sich die Druckeffekte jeweils benachbarter Gruppen von Aminosäuren. Dieses Verhalten ist für die Koeffizienten aller Resonanzen (Abb.5.14.) zu erkennen. Bei den  $H^N$ -Signalen ist dieses alternierende Verhalten auch zwischen den  $\beta$ -Strängen 1-3 zu beobachten.

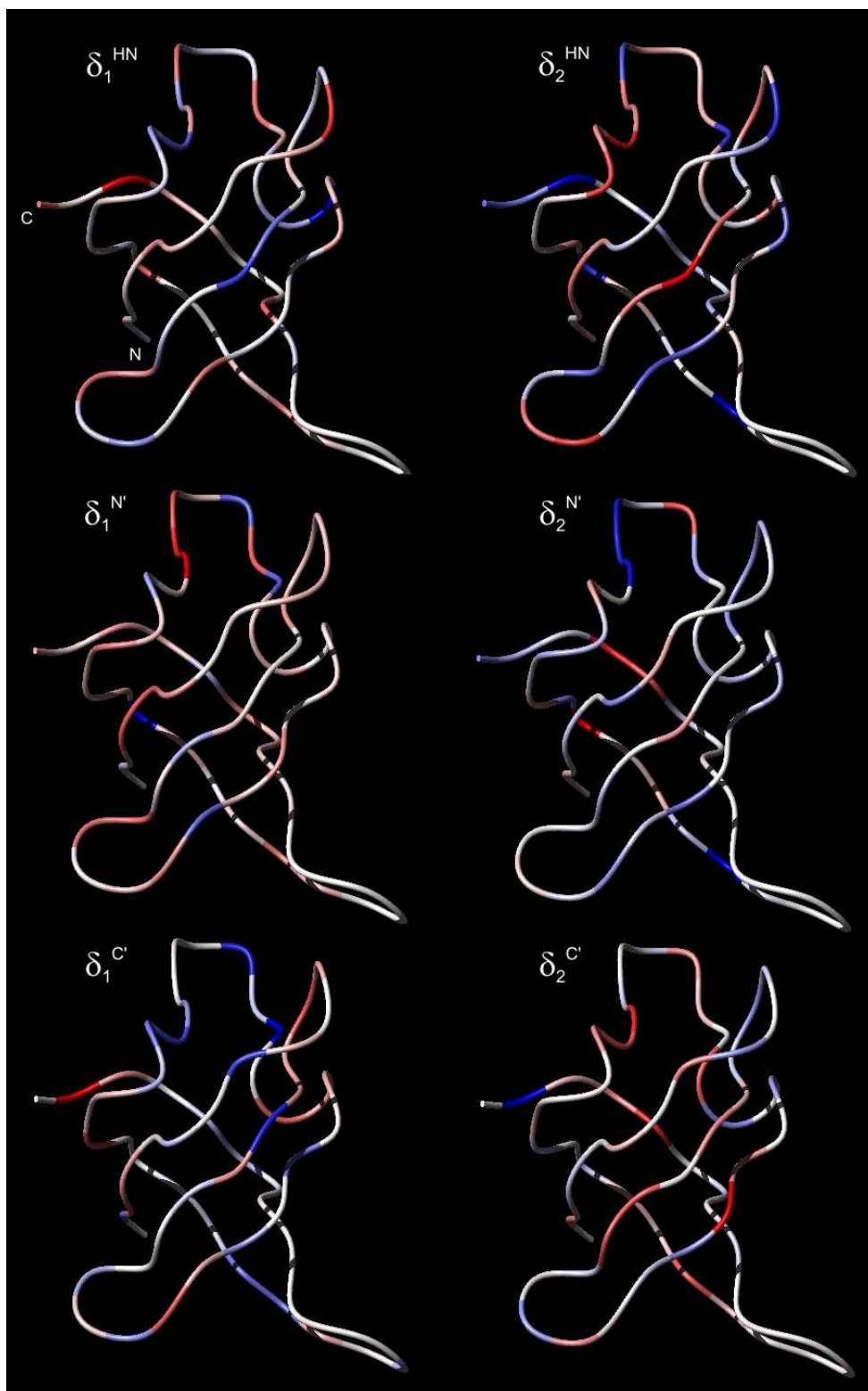


Abb.5.14. Die linearen und quadratischen Koeffizienten der Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen bei Druckvariation von 0,1 bis 200 MPa und 303 K. Gezeigt werden die  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -,  $^{15}\text{N}^{\text{C'}}$ - und  $^{13}\text{C}^{\text{C'}}$ -Signale. Große Änderungen zeigen sich hauptsächlich in der langen frei beweglichen Schleife am oberen Ende der Darstellungen. Auffallend ist, dass an zahlreichen Stellen das Vorzeichen des linearen Koeffizienten (linke Bilder) genau umgekehrt zum quadratischen Koeffizienten (rechte Bilder) ist.

### 5.4.3. Vergleich der Druckdaten mit anderen Proteinen

Vergleichsdaten mit anderen Proteinen wurden bereits bei der Betrachtung der Tetrapeptide gezeigt (Tab.4.17.). Wie den dort tabellierten Daten entnommen werden kann, ist die Streubreite der Daten von *TmCsp* gegenüber den Werten in den ungefalteten Tetrapeptiden hoch, im Vergleich zu anderen Proteinen jedoch eher gering. In Abb.5.15. ist eine Auftragung der quadratischen Koeffizienten gegen die linearen Koeffizienten der Regressionsanalysen der Druckabhängigkeit von  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen zu finden. Zusätzlich werden in gleicher Darstellung die Druckkoeffizienten der Amidprotonen der Tetrapeptide aus Kapitel gezeigt. Die Auftragung dieser Daten erfolgte in den von Akasaka und Li (2001) gewählten Einheiten  $\text{ppm bar}^{-1}$  und  $\text{ppm bar}^{-2}$ , um den Vergleich mit den dort dargestellten Daten zu erleichtern. Auch beim Vergleich der Diagramme in Abb.5.15. mit Darstellungen anderer Proteine von Akasaka und Li (2001) zeigt sich das hochgradig lineare Verhalten von *TmCsp*. Die hohe Linearität der *TmCsp* Druckdaten ist durch die zur thermischen Stabilisierung notwendige rigide Struktur des Proteins zu erklären, die keine alternativen Formationen innerhalb des hier experimentell zugänglichen Druckbereichs zulässt.

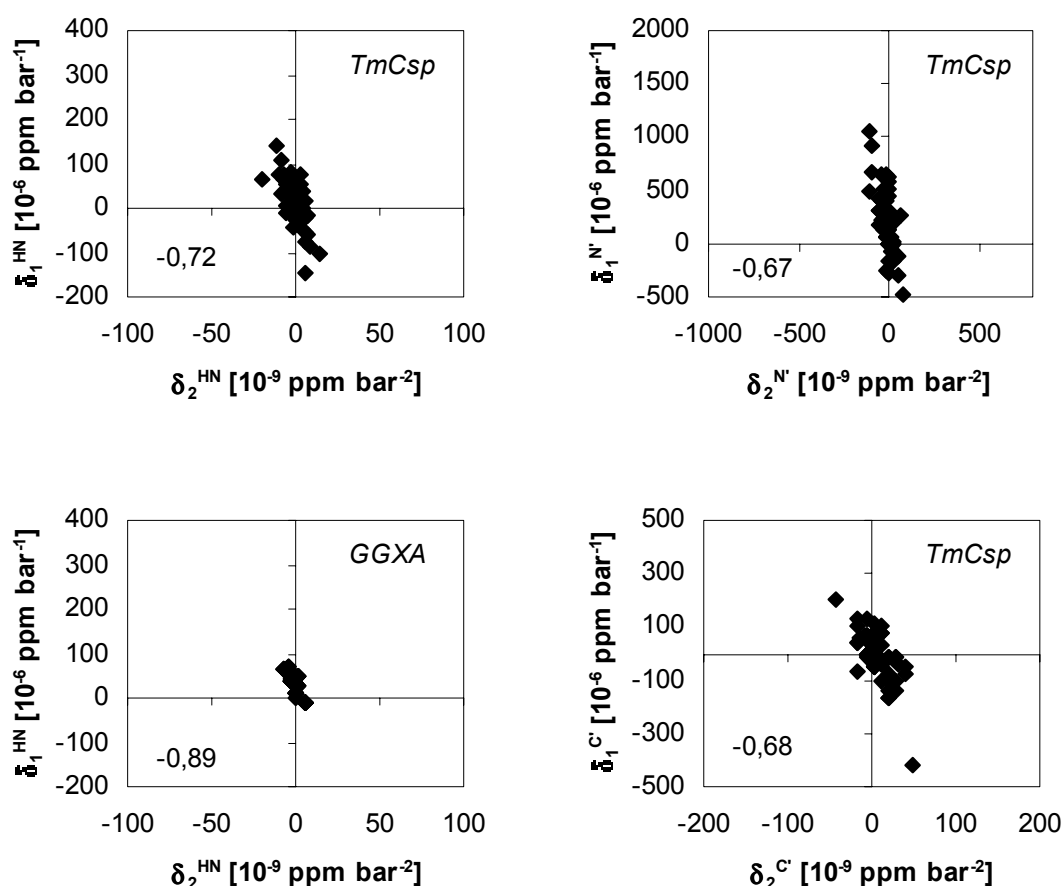


Abb.5.15. Die Graphen zeigen die Auftragung der quadratischen Koeffizienten gegen die linearen Koeffizienten. Zu Gunsten der Vergleichbarkeit mit den Daten von Akasaka & Li (2001) wurden die Einheiten in  $\text{ppm bar}^{-1}$ , bzw.  $\text{ppm bar}^{-2}$  gewählt. Die Verteilung ist für die ungefalteten Tetrapeptide auf einen wesentlich engeren Bereich begrenzt, als die Verteilung der Daten von *TmCsp*. Gegenüber anderen, von Akasaka und Li dargestellten, Proteinen verhält sich *TmCsp* hochgradig linear. Die Werte im dritten Quadranten sind die Pearson'schen Korrelationskoeffizienten der linearen mit den quadratischen Koeffizienten.

#### 5.4.4. Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen

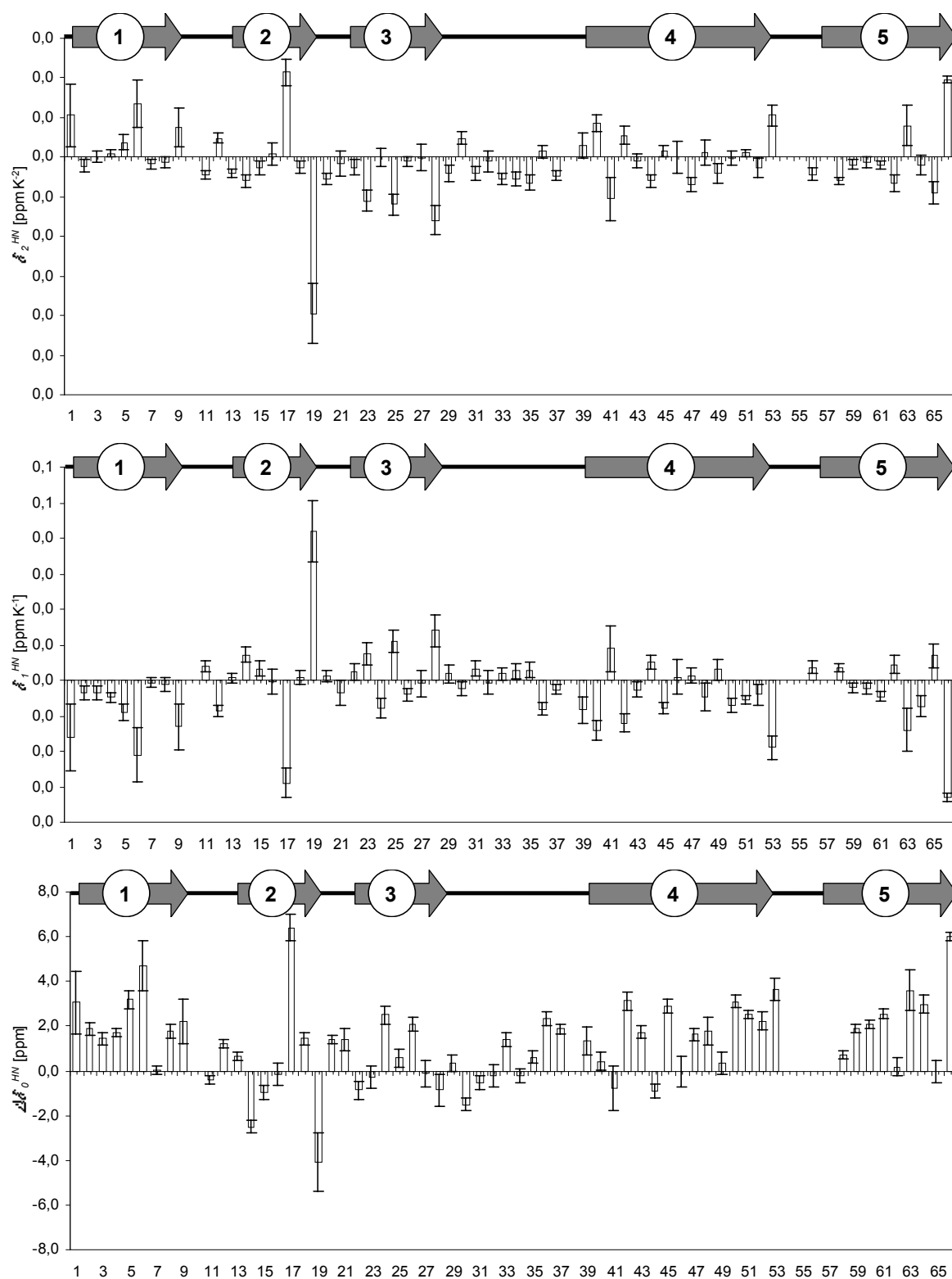
Im Gegensatz zu den weitgehend linearen Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen von *TmCsp* verhalten sich die Temperaturabhängigkeiten der einzelnen Aminosäuren wesentlich stärker nichtlinear. Die Koeffizienten der quadratischen Polynome der  $^1\text{H}^{\text{N}}$ - und  $^{15}\text{N}^{\text{C}}$ -Signale aus den HSQC Spektren bei 200 MPa im Temperaturbereich 255 K bis 339 K sind in Tab.10.13. und Tab.10.14. aufgetragen, die Koeffizienten der  $^{13}\text{C}$ -HNCO Spektren in Tab.10.15. In graphischer Darstellung sind diese Daten in den Abb.5.16./17./18. zu finden. Um Informationen über die durch die Sekundärstruktur bedingten Abweichungen  $\Delta\delta_0$  der chemischen Verschiebungen zu erhalten, wurden von den konstanten Koeffizienten die chemischen Verschiebungen ungefalteter Proteine aus der BMRB-Datenbank subtrahiert. Jeweils die unteren Balkendiagramme (Abb.5.16.-18.) zeigen die Werte  $\Delta\delta_0$  für alle drei beobachteten Resonanzen. Zusätzlich werden die quadratischen und linearen Koeffizienten der  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -,  $^{15}\text{N}^{\text{C}}$ - und  $^{13}\text{C}^{\text{C}}$ - Signale in der dreidimensionalen Struktur von *TmCsp* (Strukturdaten von Kremer et al. 2001) durch die Färbung des Proteinerückgrats in Abb.5.19. visualisiert. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm MolMol. Negative Werte sind blau gefärbt, positive rot. Neutrales Verhalten ist durch helle oder weiße Färbung gekennzeichnet.

Für die  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Signale zeigt sich ein besonders hoher Effekt für die Aminosäure K19. Lysin 19 liegt am C-terminalen Ende des  $\beta$ -Strangs 2. Auch für die  $^{15}\text{N}^{\text{C}}$ - und  $^{13}\text{C}^{\text{C}}$ - Signale zeigt relativ hohe Werte, während sich die daran anschließende Schleife neutral verhält (Abb.5.19.). Zum Übergang in den  $\beta$ -Strang 3 zeigt sich wieder ein Bereich hoher Temperaturabhängigkeiten aller Resonanzen.

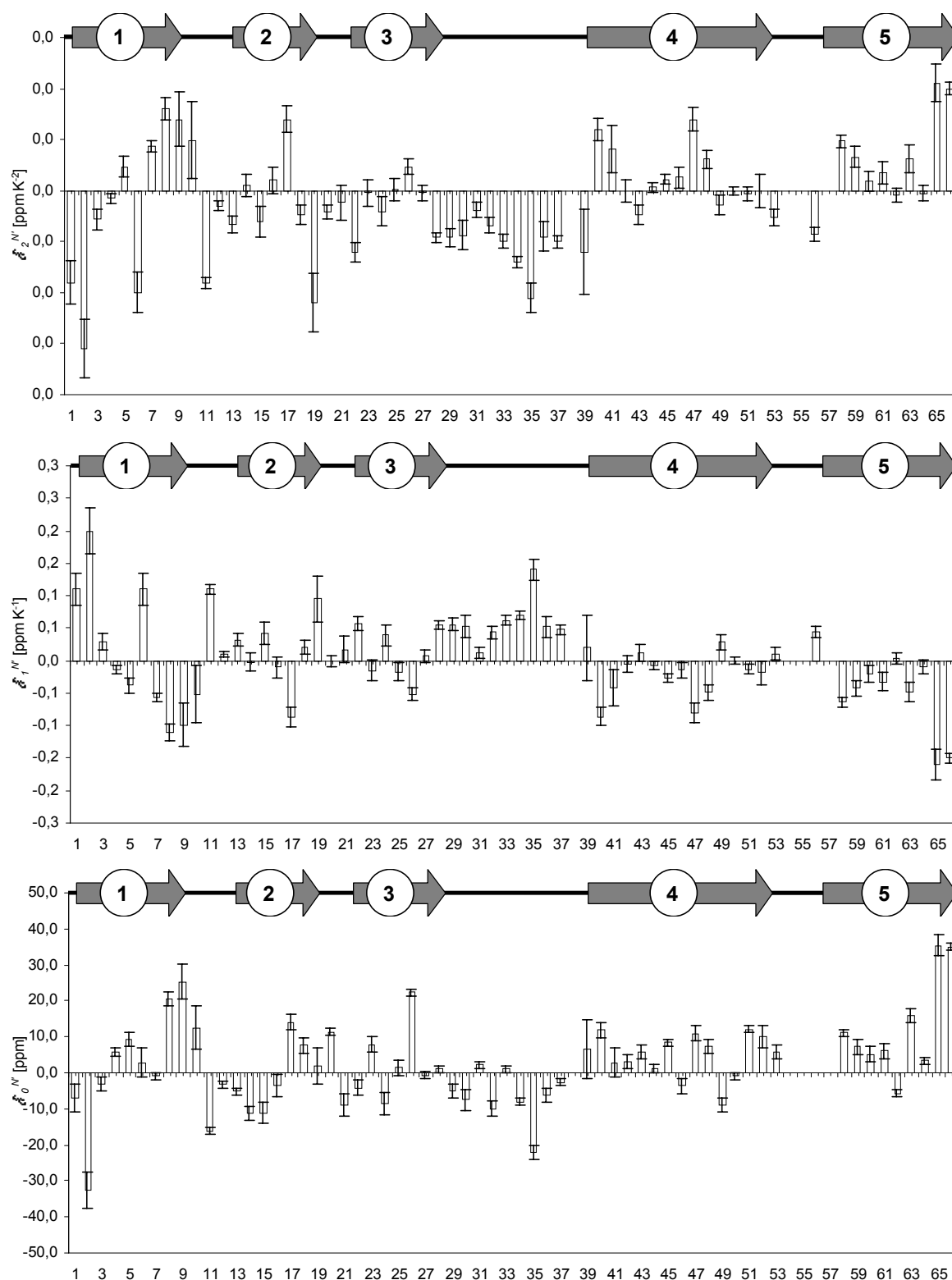
Für die  $^{15}\text{N}^{\text{C}}$ -Verschiebungen treten starke Änderungen gehäuft im Schleifenbereich zwischen  $\beta$ -Strang 3 und 4 auf. In diesem Bereich sind zwar keine Sekundärstrukturelemente zu finden, dennoch ist die Region durch zahlreiche Windungen gekennzeichnet, die durch sterische Restriktionen aufgrund der Seitenketten bedingt sein müssen. Da die  $^{15}\text{N}^{\text{C}}$ -Signale sensitiv auf Änderungen der Diederwinkel reagieren, scheint die Variation der Temperatur starke Auswirkungen auf die Konformation dieses Bereichs zu haben. Die  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Signale zeigen kaum Reaktionen auf Temperaturänderungen in diesem Teil des Proteins, die  $^{13}\text{C}^{\text{C}}$ -Signale ändern sich nur bei E35 und G36. Da die chemischen Verschiebungen von  $^{13}\text{C}^{\text{C}}$ - und  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Resonanzen auf die Stärke von Wasserstoffbrücken reagieren, kann davon ausgegangen werden, dass hauptsächlich Torsionen des Proteinerückgrates in dieser Schleife zu den Temperaturabhängigkeiten der  $^{15}\text{N}^{\text{C}}$ -Signale führen, während die Anordnung der Wasserstoffbrücken weitgehend stabil bleibt. Bei allen drei betrachteten Resonanzen des Proteinerückgrates, vor allem aber den  $^{13}\text{C}^{\text{C}}$ -Resonanzen, fällt das neutrale oder nur schwach temperaturabhängige Verhalten der chemischen Verschiebungen in den Bereichen der fünf  $\beta$ -Stränge auf. Weil die  $^{13}\text{C}^{\text{C}}$ -Resonanzen ein Indikator für die Stärke der Wasserstoffbrücken sind, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass die Struktur und Ausrichtung der Wasserstoffbrücken inert gegen Temperaturänderungen ist. Die schwachen Temperaturabhängigkeiten in den  $\beta$ -Strängen spiegeln die hohe Temperaturstabilität des Proteins *TmCsp* wider.

Weiterhin verdienen die  $^{15}\text{N}^{\text{C}}$ - und  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Signale der Aminosäuren K6 und I17 Aufmerksamkeit. Während die beiden linearen Koeffizienten der Protonensignale negative Änderungen der chemischen Verschiebung mit der Temperatur zeigen, sind diese bei den  $^{15}\text{N}^{\text{C}}$ -Signalen positiv. Was durch die unterschiedliche Reaktion der beiden Resonanzen auf Wasserstoffbrücken zu erklären ist. Das Interessante an diesem Verhalten ist jedoch die Tatsache, dass beide Aminosäuren benachbart zu W7 und F16 liegen die, wie später gezeigt wird, ein anomales Druck- und Temperaturverhalten aufweisen.

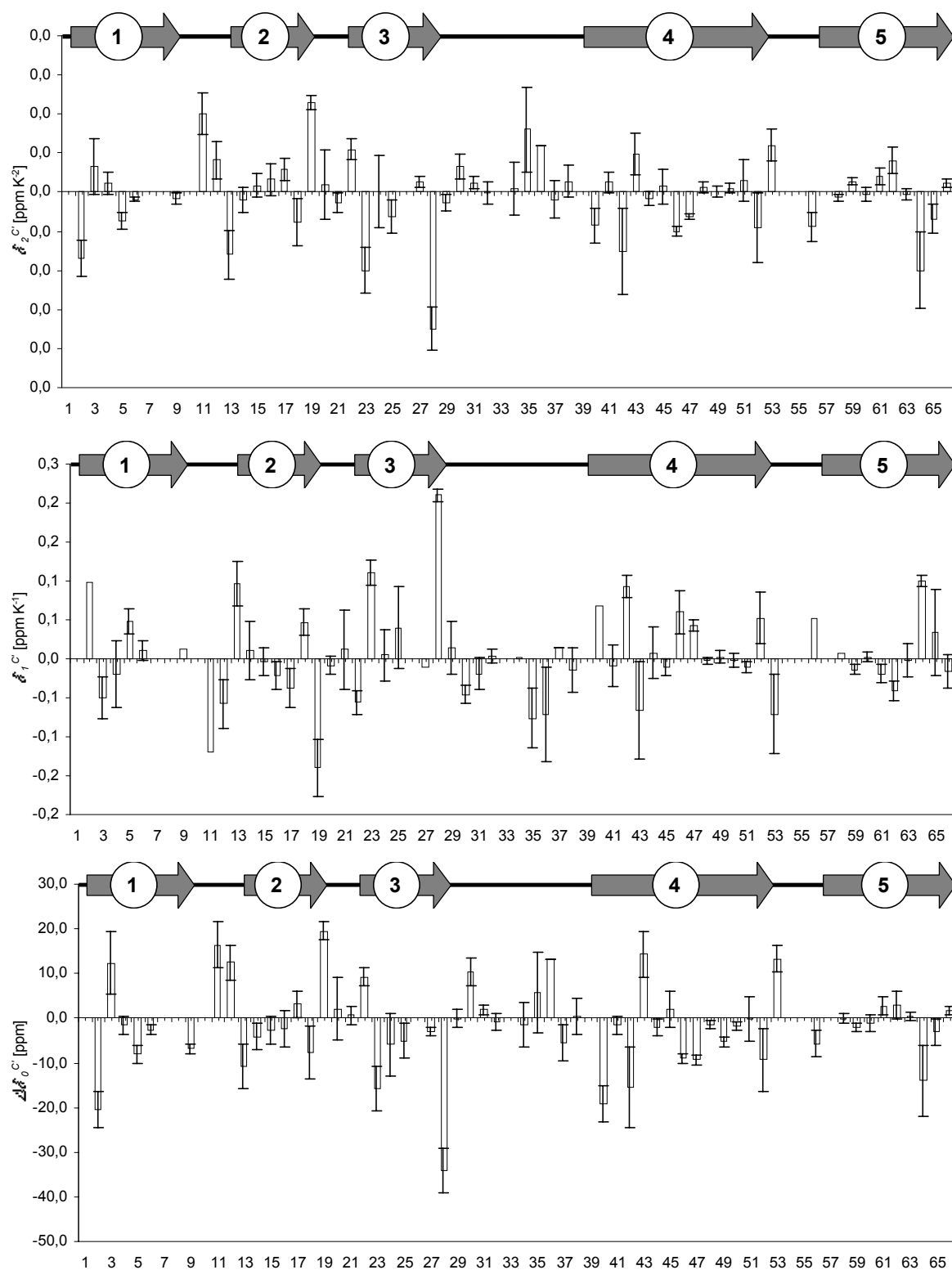




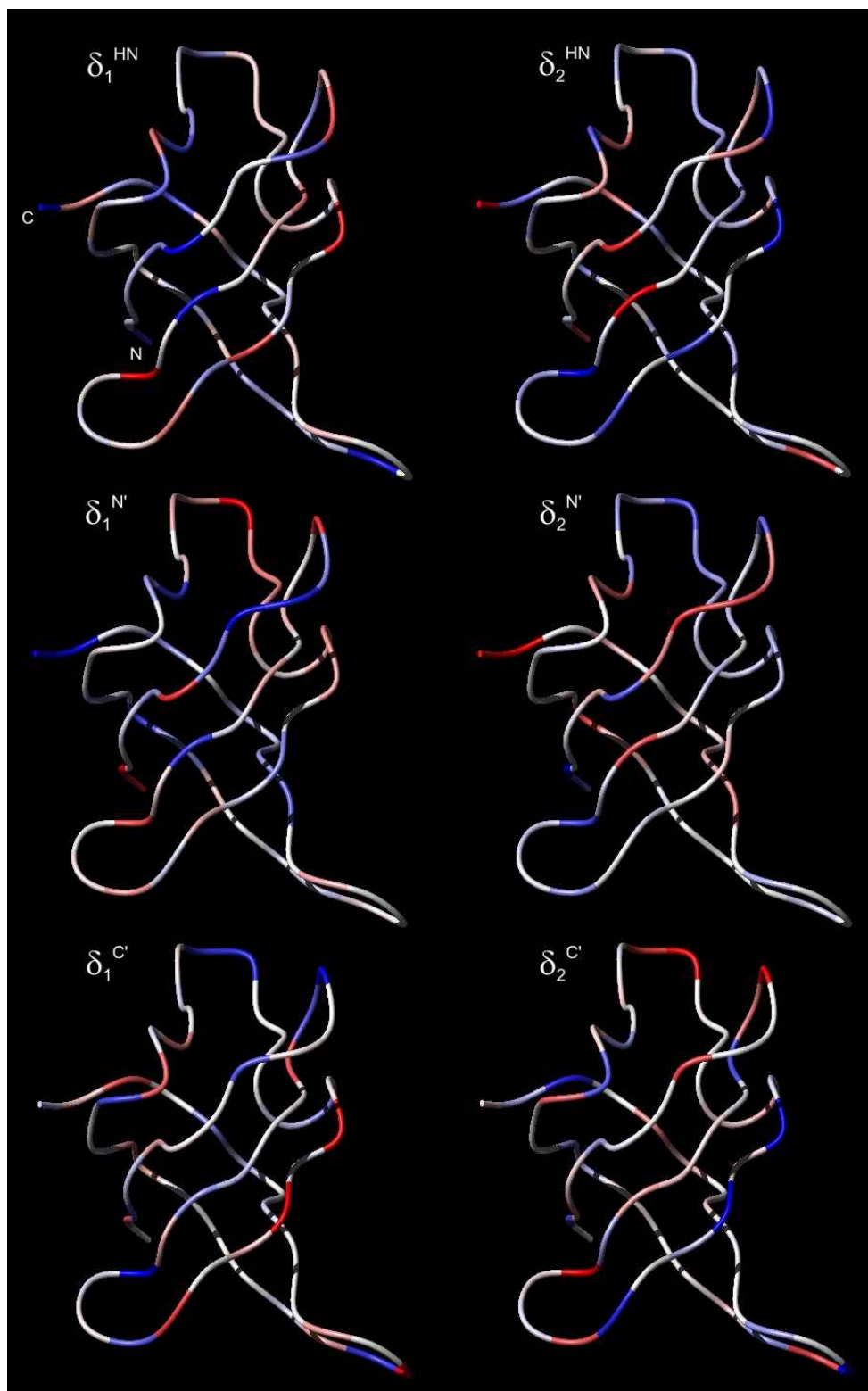
Tab.5.16. Die Koeffizienten der quadratischen Polynome zur Näherung der Temperaturabhängigkeit von 255 bis 339 K der chemischen Verschiebung der  $\text{H}^{\text{N}}$ -Protonen bei 200 MPa. Unten: Die konstanten Koeffizienten vermindert um die chemische Verschiebung ungefalteter Proteine. Mitte: Die linearen Koeffizienten. Oben: Die quadratischen Koeffizienten.



Tab.5.17. Die Koeffizienten der quadratischen Polynome zur Näherung der Temperaturabhängigkeit von 255 bis 339 K der chemischen Verschiebung der  $^{15}\text{N}$ -Signale bei 200 MPa. Unten: Die konstanten Koeffizienten vermindert um die chemische Verschiebung ungefalteter Proteine. Mitte: Die linearen Koeffizienten. Oben: Die quadratischen Koeffizienten.



Tab.5.18. Die Koeffizienten der quadratischen Polynome zur Näherung der Temperaturabhängigkeit von 255 bis 339 K der chemischen Verschiebung der  $^{13}\text{C}$ -Signale bei 200 MPa. Unten: Die konstanten Koeffizienten vermindert um die chemische Verschiebung ungefalteter Proteine. Mitte: Die linearen Koeffizienten. Oben: Die quadratischen Koeffizienten.



Tab.5.19. Die linearen und quadratischen Koeffizienten der Polynome zur Näherung der Temperaturabhängigkeit von 255 bis 339 K der chemischen Verschiebungen bei 200 MPa. Oben: die  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Protonen, auffallend sind die Änderungen am Beginn der  $\beta$ -Stränge 1,2,3. Mitte: die  $^{15}\text{N}^{\text{r}}$ -Signale, starke Änderungen in Schleifen und  $\beta$ -Strang 1. Unten: Die Auswirkungen in den  $\beta$ -Strängen sind durchwegs sehr gering.

#### 5.4.5. Korrelationen der Druck- und Temperaturkoeffizienten

Zum Auffinden linearer Zusammenhänge zwischen den Druck- und Temperaturkoeffizienten der quadratischen Regressionsanalyse der gemessenen Daten der chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}^N$ -,  $^{15}\text{N}^C$  und  $^{13}\text{C}^C$ -Resonanzen werden diese mit verschiedenen Daten korreliert. Zum Nachweis einer linearen Abhängigkeit wird die Pearson Korrelationen nach Gl.5.19. verwendet. Alle Daten, die zur Aufstellung der Korrelationstabellen Tab.5.3. und Tab.5.4. verwendet wurden, sind im Anhang in Tab.10.20. zu finden. Die Bezeichnung der Spalten in Tab.5.3./4. wird im Folgenden erläutert:

**S:** Als erster Datensatz zur Korrelation wird die Sekundärstruktur verwendet. Eine Position im  $\beta$ -Strang wird durch  $S = 1$  symbolisiert, die Position in der Schleife wird mit  $S = 0$  angegeben. Basis dieser Angaben ist die *TmCsp* Struktur von Kremer et al. (2001) bei 303 K.

**E<sub>OH</sub>:** In dieser Spalte werden die, mit dem Programm AURELIA (Neidig et al. 1995) aus der *TmCsp* Struktur berechneten, Energien der Wasserstoffbrücken zur Korrelation herangezogen.

**R<sub>B</sub>:** Zur Korrelation werden auch die von der Sequenz abhängigen Daten der Austauschraten der Amidprotonen nach Bai und Englander (1993) verwendet. Diese Austauschraten werden ausschließlich aus der Sequenz berechnet, Sekundärstrukturelemente gehen nicht ein. Es ist daher nicht sinnvoll diese Daten mit den Daten des gesamten Proteinrückgrates zu kombinieren, stattdessen werden separate Korrelationskoeffizienten mit Schleifen und  $\beta$ -Faltblättern in Tab.5.3./4. angegeben.

**R<sub>K</sub>:** Als weiterer Datensatz zur Korrelation dienen die Austauschraten der Amidprotonen in *TmCsp* gemäß den qualitativen Angaben von Kremer et al. (2001). Diese qualitativen Angaben werden hier wie folgt quantifiziert: eine hohe Austauschrate wird mit  $R_K = 10$  bewertet, eine moderate mit  $R_K = 4$  und den stabilen Aminosäuren ohne Austausch wird der Wert  $R_K = 0$  zugeordnet.

**$\delta_0(p)$ ,  $\delta_1(p)$ ,  $\delta_2(p)$ :** Die Druckdaten werden schließlich mit den konstanten ( $\delta_0$ ), linearen ( $\delta_1$ ) und quadratischen ( $\delta_2$ ) Druckkoeffizienten des Modellsystems ungefalteter Proteine GGXA bei pH 5,4 mit den an *TmCsp* gemessenen Daten korreliert. Zu diesem Zweck wurden die Daten der Tetrapeptide entsprechend der Sequenz von *TmCsp* zusammengestellt. Auch hier werden separate Korrelationskoeffizienten für Schleifen und  $\beta$ -Faltblätter angegeben.

**$\delta_1(T)$ :** Für die Temperaturdaten werden die Korrelationen mit den Temperaturkoeffizienten des den Tetrapeptiden vergleichbaren Systems GGXGG berechnet (Merutka et al. 1994). Für das System GGXGG sind nur die linearen Temperaturkoeffizienten im Bereich 278 K - 328 K bekannt. Wiederum werden getrennte Korrelationskoeffizienten für Schleifen,  $\beta$ -Faltblätter und auch das gesamte Molekül ohne Beachtung der Sekundärstrukturelemente angegeben.

In Tab.5.5. werden die Korrelationen der konstanten, linearen und quadratischen Druckkoeffizienten mit den Temperaturkoeffizienten von *TmCsp* gezeigt. Die  $^{13}\text{C}^C$ -Signale werden mit den  $^1\text{H}^N$ - und  $^{15}\text{N}^C$ -Signalen der Aminosäure, zu der das Carboxyl-C-Atom gehört, als auch mit den Signalen der in der Sequenz folgenden Aminosäure korreliert.

Pearson Korrelationskoeffizient für die Druckkoeffizienten											
	ges. Sequenz			Schleife				$\beta$ -Strang			
	S	E <sub>OH</sub>	R <sub>K</sub>	R <sub>B</sub>	$\delta_2(p)$	$\delta_1(p)$	$\delta_0(p)$	R <sub>B</sub>	$\delta_2(p)$	$\delta_1(p)$	$\delta_0(p)$
$\delta_2^{HN}(p)$	-0,24	0,03	0,01	-0,06	-0,24	0,10	-0,06	0,01	-0,06	0,10	-0,20
$\delta_1^{HN}(p)$	0,20	0,07	0,04	-0,14	0,26	-0,11	0,12	0,04	-0,08	-0,02	0,08
$\delta_0^{HN}(p)$	<b>0,35</b>	-0,21	-0,19	-0,02	<b>0,59</b>	<b>-0,55</b>	<b>0,56</b>	-0,04	-0,09	0,06	0,19
$\delta_2^{N'}(p)$	0,20	-0,19	-0,26	<b>-0,31</b>	0,21	<b>-0,35</b>	<b>0,38</b>	0,10	0,20	-0,19	0,06
$\delta_1^{N'}(p)$	-0,11	0,07	0,13	0,27	<b>-0,30</b>	<b>0,44</b>	<b>-0,42</b>	-0,18	-0,17	0,15	0,00
$\delta_0^{N'}(p)$	0,04	-0,08	0,00	<b>-0,46</b>	0,21	-0,12	<b>0,30</b>	-0,03	-0,23	<b>0,35</b>	-0,10
$\delta_2^{C'}(p)$	0,03	0,02	-0,09	<b>-0,31</b>	-0,27	0,28	-0,36	0,13	-0,02	0,10	-0,09
$\delta_1^{C'}(p)$	-0,03	-0,01	0,02	<b>0,53</b>	-0,06	0,03	-0,06	-0,14	-0,14	-0,01	-0,07
$\delta_0^{C'}(p)$	-0,25	0,06	0,20	0,01	0,14	-0,18	0,18	<b>-0,32</b>	-0,25	0,11	-0,19
<sup>a)</sup> $\delta_2^{C'}(p)$	0,06	-0,17	-0,15	-0,29	-0,24	0,22	-0,16	0,04	0,01	-0,07	-0,04
<sup>a)</sup> $\delta_1^{C'}(p)$	-0,02	0,21	0,14	<b>0,51</b>	0,17	-0,21	0,09	0,22	0,09	-0,13	0,25
<sup>a)</sup> $\delta_0^{C'}(p)$	-0,16	0,22	<b>0,35</b>	-0,03	0,30	-0,25	0,30	0,16	-0,18	0,15	0,08

Tab.5.3 Tabelle der Pearson'schen Korrelationen verschiedener Daten mit den Druckkoeffizienten der quadratischen Regressionsanalyse der gemessenen Daten der chemischen Verschiebungen der  $H^N$ -,  $^{15}N^c$  und  $^{13}C^c$ -Resonanzen von *TmCsp*. Korrelationen mit einem Absolutbetrag größer oder gleich 0,3 sind hervorgehoben. Die mit <sup>a)</sup> gekennzeichneten Daten sind Korrelationen der  $^{13}C^c$ -Kerne mit denen der in der Sequenz folgenden Aminosäure. Die Korrelationen wurden zum Teil separiert nach  $\beta$ -Strang, Schleife und für die gesamte Sequenz ausgeführt. Die Erklärung zu den Bezeichnungen der Spalten ist im Text zu finden.

#### Korrelationen der Druckkoeffizienten:

Die höchsten Korrelationen findet man für die konstanten Koeffizienten der  $H^N$ -Signale von *TmCsp* in den Schleifenregionen mit den konstanten, linearen und quadratischen Koeffizienten der Amidprotonen der Tetrapeptide. Dies zeigt, dass die Schleifenbereiche von *TmCsp* der vollkommen entfalteten Struktur nahe kommen. Dennoch unterscheidet sich das Verhalten, wenn man die niedrigen Korrelationen der linearen und quadratischen Koeffizienten der Druckabhängigkeit  $\delta_1^{HN}$  und  $\delta_2^{HN}$  mit den Druckkoeffizienten  $\delta_0$ ,  $\delta_1$  und  $\delta_2$  der Tetrapeptide betrachtet.

Auch für die Korrelationen der Druckkoeffizienten  $\delta_1^{N'}$  und  $\delta_2^{N'}$  in den Schleifenregionen mit den Koeffizienten der Tetrapeptide  $\delta_0$ ,  $\delta_1$  und  $\delta_2$  sind Werte über 0,3 zu finden. Die Korrelationen von  $\delta_1^{N'}$  und  $\delta_2^{N'}$  in den  $\beta$ -Strängen mit den  $\delta_0$ ,  $\delta_1$  und  $\delta_2$  der Tetrapeptide sind dagegen erheblich geringer. Dies bedeutet, dass den Koeffizienten  $\delta_1^{N'}$  und  $\delta_2^{N'}$  eine gewisse Information über die Sekundärstruktur entnommen werden kann.

Auffallend ist die Korrelation des Koeffizienten  $\delta_1^{C'}$  mit den aus der Sequenz berechneten Austauschraten von Bai und Englander (1993) und zwar für die Aminosäure, zu der das Carbonylatom gehört, als auch zu der in der Sequenz folgenden Aminosäure. Diese Austauschraten werden durch sterische Hemmung der benachbarten Aminosäuren bewirkt. Dies ist ein Indiz dafür, dass  $^{13}C^c$  sensitiv auf druckinduzierte Änderungen der Struktur der beiden an das Carbonylatom grenzenden Aminosäuren reagiert, soweit diese sich in Schleifen befinden.

Insgesamt sind die Korrelationen der Datensätze zueinander jedoch gering. Dies spiegelt die sehr vielschichtigen Ursachen der chemischen Verschiebungen wieder, kein Effekt ist so stark, dass er die anderen dominieren würde, hohe Abhängigkeiten treten demzufolge nicht auf.

Pearson Korrelationskoeffizient für die Temperaturkoeffizienten								
	ges. Sequenz				Schleife		$\beta$ -Strang	
	S	E <sub>OH</sub>	R <sub>K</sub>	$\delta_1(T)$	R <sub>B</sub>	$\delta_1(T)$	R <sub>B</sub>	$\delta_1(T)$
$\delta_2^{HN}(T)$	-0,09	-0,01	0,01	-0,01	<b>-0,33</b>	0,07	-0,03	0,00
$\delta_1^{HN}(T)$	0,10	-0,06	-0,09	0,06	<b>0,41</b>	0,00	-0,01	0,04
$\delta_0^{HN}(T)$	0,05	0,03	0,06	-0,15	<b>-0,48</b>	-0,30	0,04	-0,11
$\delta_2^{N'}(T)$	0,24	-0,25	-0,29	0,16	-0,10	-0,05	<b>-0,54</b>	0,16
$\delta_1^{N'}(T)$	-0,22	0,26	0,25	-0,16	0,06	0,08	<b>0,57</b>	-0,19
$\delta_0^{N'}(T)$	0,20	-0,26	-0,19	0,21	<b>-0,31</b>	-0,02	<b>-0,49</b>	0,26
$\delta_2^{C'}(T)$	-0,11	-0,08	0,06	-0,06	-0,06	-0,07	-0,23	0,00
$\delta_1^{C'}(T)$	0,10	0,07	-0,06	0,06	0,01	0,09	0,21	0,00
$\delta_0^{C'}(T)$	-0,14	-0,05	0,09	-0,08	0,03	-0,15	-0,25	0,02
<sup>a)</sup> $\delta_2^{C'}(T)$	-0,03	0,19	0,12	-0,17	-0,07	-0,10	0,16	-0,21
<sup>a)</sup> $\delta_1^{C'}(T)$	0,02	-0,19	-0,13	0,18	0,06	0,12	-0,19	0,23
<sup>a)</sup> $\delta_0^{C'}(T)$	-0,05	0,22	0,19	-0,21	-0,03	-0,15	0,24	-0,25

Tab.5.4. Tabelle der Pearson Korrelationen verschiedener Daten mit den Temperaturkoeffizienten der quadratischen Regressionsanalyse der gemessenen Daten der chemischen Verschiebungen der  $H^N$ -,  $^{15}N'$  und  $^{13}C'$ -Resonanzen von *TmCsp*. Korrelationen mit einem Absolutbetrag größer oder gleich 0,3 sind hervorgehoben. Die mit <sup>a)</sup> gekennzeichneten Daten sind Korrelationen der  $^{13}C'$ -Kerne mit den Resonanzen der in der Sequenz folgenden Aminosäure. Die Erklärung zu den Bezeichnungen der Spalten ist im Text zu finden.

#### Korrelationen der Temperaturkoeffizienten:

Besonders hohe Korrelationen findet man bei den Korrelationen der konstanten, linearen und quadratischen Koeffizienten der Temperaturabhängigkeit der  $H^N$ -Protonen in den Schleifenregionen mit den Werten der Austauschraten von Bai und Englander (1993). Erstaunlich ist jedoch die hohe Korrelation der  $^{15}N'$ -Koeffizienten mit den Austauschraten in den  $\beta$ -Strängen. Auch hier zeigt sich wieder, dass die  $^{15}N'$ -Resonanzen ein Indikator für Sekundärstrukturelemente sind. Die  $^{15}N'$ -Resonanzen sind nach Li et al. (1998) abhängig von der Bindungslänge der Wasserstoffbrückenbindungen. Mit steigender Temperatur verlängern sich die Wasserstoffbrücken (Tilton et al. 1992), worauf die chemische Verschiebung der  $^{15}N'$ -Kerne reagiert. Die Austauschraten nach Bai und Englander sind ein Effekt der von der sterischen Hemmung durch die Seitenketten bedingt wird. Für eine sterisch ungünstig liegende Wasserstoffbrücke wird sich eine starke Änderung mit steigender Temperatur einstellen, während für sehr frei liegende Wasserstoffbrücken kein Effekt zu beobachten sein sollte. Damit sind die hohen  $^{15}N'$ -Korrelationen verständlich. Für die Druckeffekte sollten analoge Überlegungen zutreffen, die in Tab.5.3. angegebenen druckabhängigen Korrelationen sind jedoch geringer als die temperaturabhängigen, woraus sich leicht folgern lässt, dass die Auswirkungen von Druckvariationen im Bereich 0,1 bis 200 MPa auf die Struktur von *TmCsp* geringer sind, als die einer Temperaturvariation von 255 bis 340 K.

Für die  $^{13}C'$ -Kerne treten keine auffallenden Korrelationen mit der Temperatur auf, die höchsten Werte findet man bei den Austauschraten  $R_B$  in den  $\beta$ -Strängen und zu den linearen Koeffizienten der linearen Temperaturabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen des Modellsystems GGXGG (Merutka et al. 1994).

Pearson Korrelationskoeffizient der Druck mit den Temperaturkoeffizienten												
	$\delta_2^{\text{HN}}$	$\delta_1^{\text{HN}}$	$\delta_0^{\text{HN}}$	$\delta_2^{\text{N'}}$	$\delta_1^{\text{N'}}$	$\delta_0^{\text{N'}}$	$\delta_2^{\text{C'}}$	$\delta_1^{\text{C'}}$	$\delta_0^{\text{C' a)}$	$\delta_2^{\text{C' a)}$	$\delta_1^{\text{C' a)}$	$\delta_0^{\text{C'}}$
$\delta_2^{\text{HN}}(\text{p})$	<b>0,30</b>	-0,16	-0,19	-0,05	-0,04	0,04	0,20	-0,04	0,03	0,14	0,06	-0,21
$\delta_1^{\text{HN}}(\text{p})$	-0,18	-0,01	0,11	0,06	0,01	-0,11	-0,18	0,05	-0,03	-0,11	-0,06	0,14
$\delta_0^{\text{HN}}(\text{p})$	-0,12	<b>0,35</b>	<b>0,39</b>	-0,03	0,00	0,29	0,07	-0,08	0,12	0,05	0,04	0,06
$\delta_2^{\text{N'}}(\text{p})$	-0,07	0,05	0,01	0,15	-0,11	0,02	-0,11	0,06	-0,03	0,09	-0,12	-0,17
$\delta_1^{\text{N'}}(\text{p})$	0,09	-0,10	-0,01	-0,06	-0,03	-0,06	0,12	-0,06	-0,01	-0,11	0,14	0,19
$\delta_0^{\text{N'}}(\text{p})$	-0,27	0,29	0,19	-0,04	0,16	<b>0,56</b>	-0,12	-0,01	0,01	0,04	-0,14	0,05
$\delta_2^{\text{C'}}(\text{p})$	0,16	-0,20	0,03	0,11	-0,05	-0,14	-0,07	0,13	0,25	0,03	-0,01	0,11
$\delta_1^{\text{C'}}(\text{p})$	-0,15	0,18	-0,04	-0,09	0,03	0,15	0,13	-0,22	-0,28	0,00	-0,03	-0,13
$\delta_0^{\text{C'}}(\text{p})$	0,12	-0,15	0,09	0,03	0,02	-0,16	-0,23	<b>0,34</b>	<b>0,47</b>	-0,03	0,07	0,16
<sup>a)</sup> $\delta_2^{\text{C'}}(\text{p})$	0,02	0,07	-0,01	0,08	-0,01	-0,05	0,00	0,03	-0,11	-0,07	0,13	0,25
<sup>a)</sup> $\delta_1^{\text{C'}}(\text{p})$	-0,03	-0,07	0,00	-0,12	0,02	0,04	-0,01	-0,05	0,11	0,13	-0,22	-0,28
<sup>a)</sup> $\delta_0^{\text{C'}}(\text{p})$	-0,02	0,11	0,05	0,16	-0,06	0,05	-0,06	0,11	-0,08	-0,23	<b>0,34</b>	<b>0,47</b>

Tab.5.5. Tabelle der Pearson Korrelationen der Druckkoeffizienten mit den Temperaturkoeffizienten der quadratischen Regressionsanalyse der gemessenen Daten der chemischen Verschiebungen der  $\text{H}^{\text{N}}$ -,  $^{15}\text{N}^{\text{C'}}$  und  $^{13}\text{C}^{\text{C'}}$ -Resonanzen von *TmCsp*. Korrelationen mit einem Absolutbetrag größer oder gleich 0,3 sind hervorgehoben. Die mit <sup>a)</sup> gekennzeichneten Daten sind Korrelationen der  $^{13}\text{C}^{\text{C'}}$ -Kerne mit denen der in der Sequenz folgenden Aminosäure.

#### Korrelationen der Druck- mit den Temperaturkoeffizienten:

In Tab.5.5. zeigen sich Korrelationen über 0,3 hauptsächlich für die konstanten Druckkoeffizienten mit den konstanten Temperaturkoeffizienten. Dies ist verständlich, da die chemische Verschiebung, die den konstanten Koeffizienten weitgehend entspricht, ein qualitativer Indikator für die Sekundärstruktur ist. Insbesondere gilt dies für die  $^{13}\text{C}^{\text{C'}}$ - und  $^{15}\text{N}^{\text{C'}}$ -Signale, deren Korrelationen mit 0,47 respektive 0,56 höher liegen, als die der  $\text{H}^{\text{N}}$ -Protonen mit 0,39.

Betrachtet man die Korrelationen der linearen und quadratischen Koeffizienten von druck- und temperaturinduzierten Änderungen miteinander, sind die Werte eher niedrig. Dies bringt die Tatsache zum Ausdruck, dass die strukturellen Änderungen von *TmCsp* durch die Temperatur wesentlich weitgehender als die durch Druck bedingten sind.



#### 5.4.6. Vergleich von quadratischem und linearem Temperaturkoeffizient

Zum Vergleich verschiedener Proteine ist es in der Hochdruck-NMR üblich die quadratischen gegen die linearen Koeffizienten der Polynome zur Beschreibung des Verlaufs der chemischen Verschiebung gegeneinander aufzutragen. Dabei ergeben sich Punkteverteilungen, die charakteristische Muster für verschiedene Proteine liefern (Akasaka & Li 2001). Für die Daten zum Druck wurde dieses Verfahren bereits gezeigt, und soll nun auch auf die Temperaturdaten angewendet werden. Das Verfahren birgt jedoch, ohne genaue Beachtung der Auswirkungen eines Skalenwechsels, erhebliche Möglichkeiten einem Trugschluss über vermeintlich zu beobachtende Effekte zu erliegen. Als Beispiel werden dazu in Abb.5.20. die Graphen der quadratischen Koeffizienten aufgetragen. Wie sofort zu erkennen ist, entarten die Punktwolken zu einer Diagonalen. Dieser Effekt bedarf einer genaueren Betrachtung.

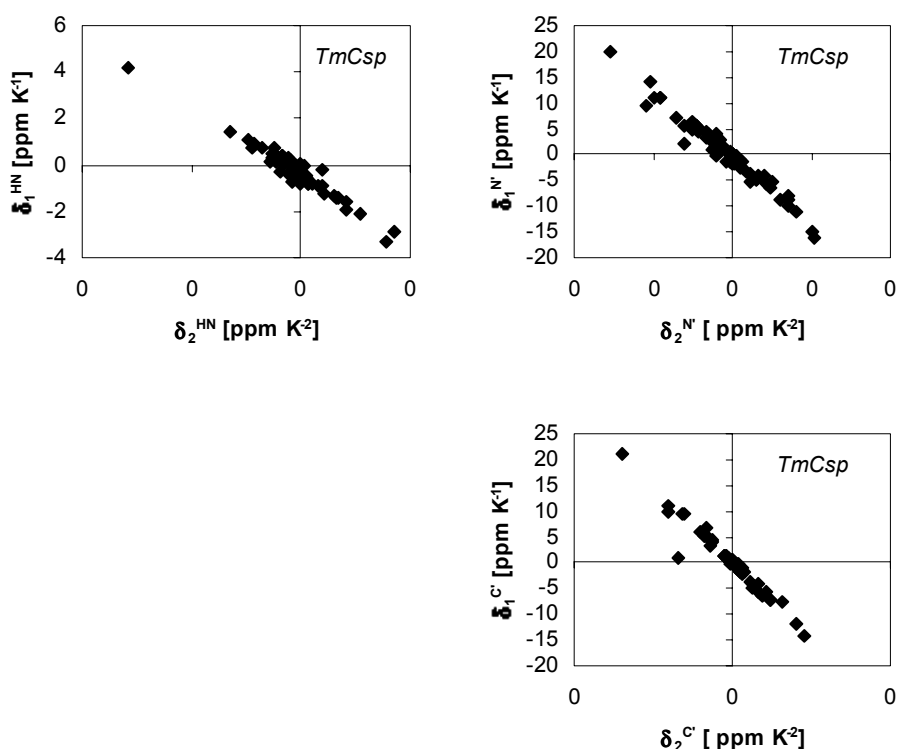


Abb.5.20. Diagramme der quadratischen gegen die linearen Koeffizienten der Regressionsanalyse der Temperaturabhängigkeit der  $\text{H}^{\text{N-}}$ ,  $^{15}\text{N}^{\text{C-}}$  und  $^{13}\text{C}^{\text{C-}}$ -Signale. Alle Graphen sind zu Diagonalen entartet. Der Druck bei allen Messungen betrug 200 MPa.

#### 5.4.7. Skalierung der Auftragung linearer gegen quadratische Koeffizienten

Die Ursache des oben gezeigten Effekts der Entartung der Auftragung der linearen gegen die quadratischen Koeffizienten der Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen zu einer Diagonalen ist in der Skalierung der Abszisse begründet.

Die chemischen Verschiebungen sind in ihrer maximalen und minimalen Amplitude begrenzt, damit sind innerhalb eines bestimmten Variationsintervalls von Temperatur oder Druck nur gewisse maximale Steigungen und Krümmungen möglich, dieser Sachverhalt wird durch

Abb.5.21. veranschaulicht. Damit ist auch der Wertebereich der quadratischen und linearen Koeffizienten eines quadratischen Polynoms der chemischen Verschiebungen bei Druck- bzw. Temperaturvariationen entsprechend Gl.5.6. begrenzt. Die analoge Gleichung des Verlaufs der chemischen Verschiebung bei Temperaturvariation ist in Gl.5.20. dargestellt.

$$\delta'(T) = \delta'_0 + \delta'_1 (T - T_0) + \delta'_2 (T - T_0)^2 \quad (\text{Gl.5.20.})$$

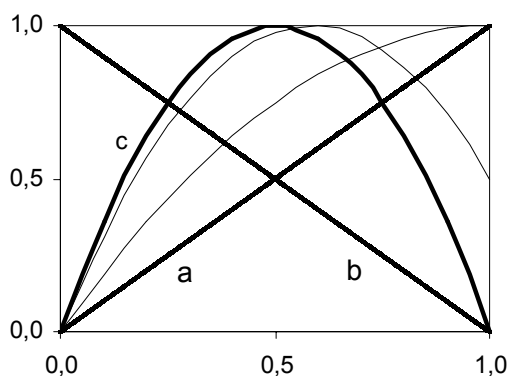


Abb.5.21. Die Abszisse symbolisiert den Wertebereich des Drucks oder der Temperatur, die Ordinate den maximal beobachtbaren Hub der chemischen Verschiebung innerhalb dieses Bereichs. Der Wertebereich der linearen und quadratischen Koeffizienten eines Polynoms der chemischen Verschiebungen ist damit ebenfalls begrenzt. Die Geraden a und b sind die größtmöglichen Steigungen bei ungekrümmtem Verlauf. Kurve c ist die Kurve mit maximalem linearem und quadratischem Koeffizienten.

Die Skalierung der Abszisse in Abb.5.5. ist auf eins normiert. Das bedeutet die Skalierung von Druck oder Temperaturwerten der experimentell ermittelten Daten muss auf dieses Intervall abgebildet werden. Die Umrechnung zwischen den Temperaturwerten  $T$  in der Kelvinskala und der normierten Temperaturskala  $T^*$  wird durch Gl.5.21.a. und Gl.5.21.b. geleistet.

$$T^* := \frac{T - T_0}{T_1 - T_0} \quad (\text{Gl.5.21.a.}) \quad T := T^* (T_1 - T_0) + T_0 \quad (\text{Gl.5.21.b.})$$

Die linearen und quadratischen Koeffizienten der durch Polynome angenäherten Druckdaten werden, sowohl in dieser Arbeit, als auch in der Literatur in ppm GPa<sup>-1</sup> und ppm GPa<sup>-2</sup> angegeben. Aufgrund technischer Gegebenheiten liegt der derzeit zugängliche Variationsbereich des Drucks von 0 bis 0,2 GPa und damit genau innerhalb der normierten Druckskala von 0 bis 1. Bei der Temperatur ist dies jedoch nicht erfüllt. In der vorliegenden Arbeit wurden die chemischen Verschiebungen innerhalb eines Temperaturbereichs von 255 K bis 340 K experimentell ermittelt. Verwendet man diese Daten direkt, ohne auf einen normierten Temperaturbereich von  $T^* = 0 \dots 1$  zu wechseln, so entartet die Auftragung der quadratischen gegen die linearen Koeffizienten der temperaturabhängigen chemischen Verschiebung zu einer Diagonalen (Abb.5.22. links).

In Abb.5.22. sind beispielhaft die möglichen Werte von linearem und quadratischem Term in originaler Temperaturskala (links) und normierter Temperaturskala (rechts) dargestellt. Die Berechnung der Graphen erfolgte unter Verwendung der Gl.5.32./33, die weiter unten abgeleitet werden.

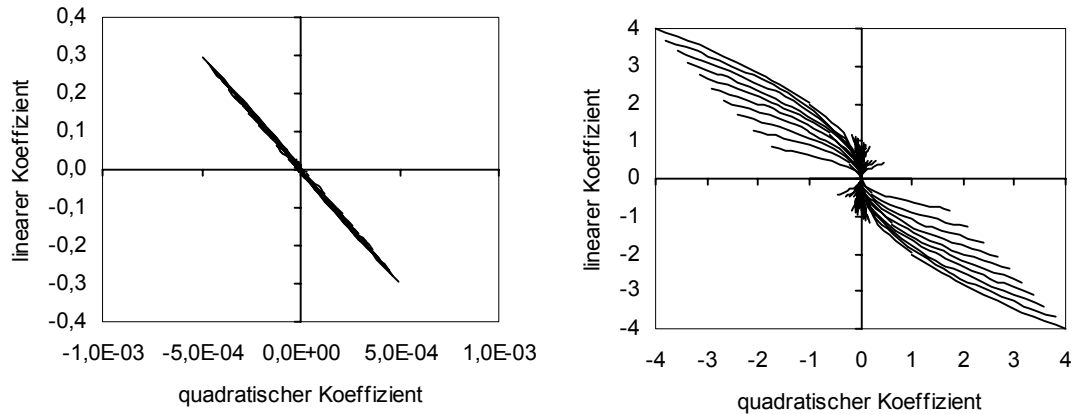


Abb.5.22. Links: Der verwendete Temperaturbereich läuft von 255-340 K, die chemische Verschiebung variiert um 1 ppm. Bildet man diesen Temperaturbereich auf das Intervall  $T^* = 0$  bis 1 ab, so erhält man die rechten Kurven.

Wichtig für die Auswertung der Daten sind die Transformationsformeln zum Übergang von der Temperaturskala  $T$  in Kelvin zur normierten Skala  $T^*$ . Mit der Forderung, dass der Verlauf der chemischen Verschiebungen in beiden Temperaturskalen identisch sein muss (Gl.5.22.), können die Transformationsformeln (Gl.5.23.-Gl.5.25.) durch Einsetzen von Gl.5.21. in Gl.5.22. und anschließendem Koeffizientenvergleich angegeben werden.

$$\delta(T) = \delta'_2 T^2 + \delta'_1 T + \delta'_0 = \delta_2^* T^{*2} + \delta_1^* T^* + \delta_0^* = \delta(T^*) \quad (\text{Gl.5.22.})$$

Die Transformationsformeln der quadratischen, linearen und konstanten Koeffizienten der Polynome zur angenäherten Darstellung der chemischen Verschiebungen zwischen den Temperaturskalen  $T$  und  $T^*$  lauten:

$$\delta_2^* = \frac{\delta'_2}{(T_1 - T_0)^2} \quad (\text{Gl.5.23.a.}) \quad \delta'_2 = \delta_2^* (T_1 - T_0)^2 \quad (\text{Gl.5.23.b.})$$

$$\delta_1^* = \frac{-2\delta'_2 T_0}{(T_1 - T_0)^2} + \frac{\delta'_1}{(T_1 - T_0)} \quad (\text{Gl.5.24.a.}) \quad \delta'_1 = 2\delta_2^* (T_1 - T_0) + \delta_1^* (T_1 - T_0) \quad (\text{Gl.5.24.b.})$$

$$\delta_0^* = \frac{\delta'_2 T_0^2}{(T_1 - T_0)^2} + \frac{\delta'_1 T_0}{(T_1 - T_0)} + \delta'_0 \quad (\text{Gl.5.25.a.}) \quad \delta'_0 = \delta_2^* T_0^2 + \delta_1^* T_0 + \delta_0^* \quad (\text{Gl.5.25.b.})$$

In den nachfolgenden Auswertungen wurde der Temperaturbereich  $T_0 = 250$  K bis  $T_1 = 350$  K auf das Intervall  $T^* = 0$  bis 1 abgebildet. Dies entspricht weitgehend dem Bereich, in dem Wasser im flüssigen Aggregatzustand unter einem Druck von maximal 200 MPa existiert und  $TmCsp$  noch nicht irreversibel denaturiert.

Da der Übergang zwischen  $T$  und  $T^*$  zu einer Änderung der Korrelation zwischen linearem und quadratischem Koeffizienten führt, sind Vergleiche der Korrelationen nur innerhalb einer Temperaturskala zulässig.

### 5.4.8. Ableitung der Formeln zur Berechnung

Im folgenden werden die Formeln zur Berechnung der Graphen in Abb.5.22. abgeleitet. Die Darstellung der chemischen Verschiebung als quadratisches Polynom im normierten System  $T^*$  lautet :

$$\delta(T^*) = \delta_2 T^{*2} + \delta_1 T^* + \delta_0 \quad (\text{Gl.5.26.})$$

Aus den Randbedingungen  $T^* = 0..1$ ,  $T_a^* = 0$  und  $T_b^* = 1$ , sowie aus Gl.5.26. ergeben sich die Gleichungen Gl.5.27. und Gl.5.28.

$$\delta_a(T_a^* = 0) = \delta_0 \quad (\text{Gl.5.27.})$$

$$\delta_b(T_b^* = 1) = \delta_2 + \delta_1 + \delta_0 \quad (\text{Gl.5.28.})$$

Bei der Temperatur  $T_c^*$  erreicht die chemische Verschiebung ihren Extremalwert  $\delta_c$ , die notwendige Randbedingung ist ein Verschwinden der Ableitung von Gl.5.26. an der Stelle  $T_c^*$ , woraus Gl.5.29. folgt.

$$\delta_c(T_c^* = T_{\max}^*) = \frac{-\delta_1^{*2}}{4\delta_2^*} + \delta_0^* \quad (\text{Gl.5.29.})$$

Für  $\delta_c$  gelten zusätzlich folgende Randbedingung:

$$|\delta_c| \leq |\delta_b| \Leftrightarrow T_{\max}^* \in [0..1] \quad (\text{Gl.5.30.})$$

$$|\delta_c| = \text{beliebig} \Leftrightarrow T_{\max}^* \notin [0..1] \quad (\text{Gl.5.31.})$$

Auflösen des Gleichungssystems (Gl.5.27-Gl.5.28.) liefert die Koeffizienten  $\delta_2^*$  und  $\delta_1^*$  (Gl.5.32. und Gl.5.33.).

$$\delta_2^* = \frac{-\delta_1^{*2}}{4(\delta_c - \delta_0^*)} \quad (\text{Gl.5.32.})$$

$$\delta_1^* = 2(\delta_c - \delta_0^*) \left( 1 \pm \sqrt{1 + \frac{(\delta_0^* - \delta_b^*)}{(\delta_c - \delta_0^*)}} \right) \quad (\text{Gl.5.33.})$$

Die Graphen in Abb.5.22. sind aus Gl.5.32. und Gl.5.33. durch Variation der Punkte  $\delta_a$  und  $\delta_b$  im Intervall 0 bis 1 zu erhalten. Die Lösungen mit positivem und negativem Vorzeichen unterscheiden sich durch die Lage des Maximums des quadratischen Polynoms innerhalb oder außerhalb des Beobachtungsbereichs.

#### 5.4.9. Quadratischer und linearer Koeffizient in normierter Skala $T^*$

Wie oben beschrieben, wird das Temperaturintervall 250 K - 350 K auf die normierte Temperaturskala  $T^* = 0 - 1$  unter Verwendung der Transformationsgleichungen Gl.5.23. – Gl.5.25. abgebildet, um sinnvolle Darstellungen der Auftragungen der quadratischen gegen die linearen Temperaturkoeffizienten zu erhalten. In Abb.5.23.-Abb.5.25 werden die Ergebnisse der Reskalierung für die  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -,  $^{15}\text{N}$ -, und  $^{13}\text{C}$ -Signale dargestellt. Vergleicht man diese Graphen mit den Graphen in Kelvin-Skalierung (Abb.5.20.) wird deutlich, dass die Daten nun aufgespreizt sind und keine nennenswerte Korrelation mehr zwischen linearem und quadratischem Koeffizienten vorhanden ist.

Eine weitere Interpretation der Daten ist nicht möglich, da Vergleichsdaten zu anderen Proteinen über das weite hier angewandte Temperaturintervall in der Literatur nicht existieren.

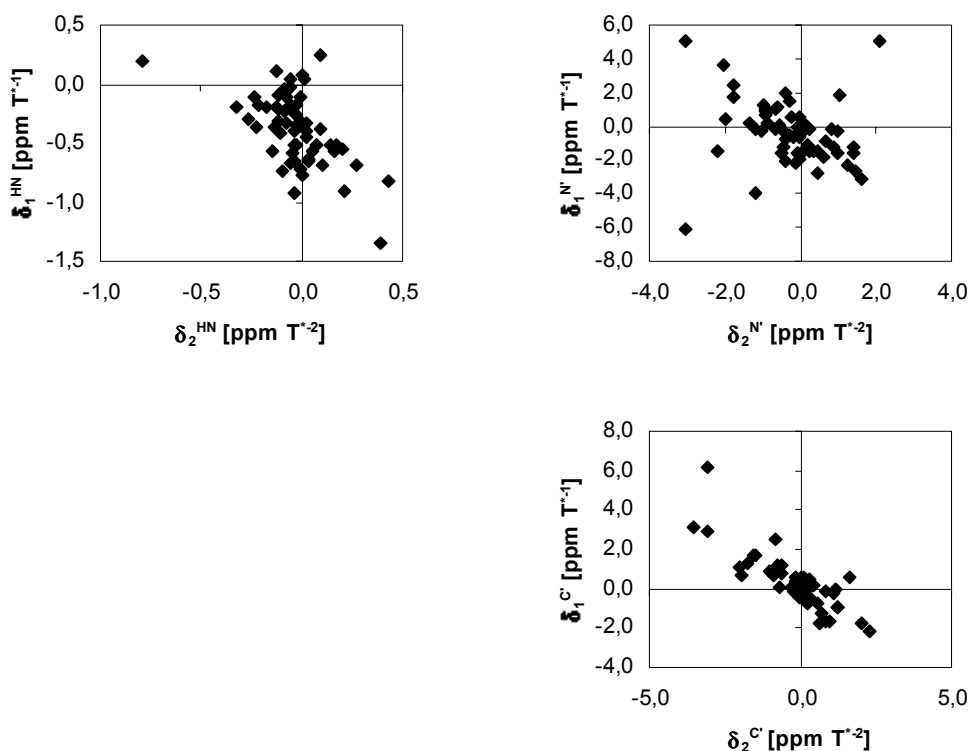


Abb.5.23. Diagramme der quadratischen gegen die linearen Koeffizienten der Regressionsanalyse der Temperaturabhängigkeit der  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Signale. Als Temperaturskala wurde das Temperaturintervall 250 K – 350 K auf das Intervall 0 bis 1 der normierten Temperaturskala  $T^*$  abgebildet. Diese Umrechnung entzerzt die zu Diagonalen entarteten Graphen aus Abb.5.20. zu den hier dargestellten Graphen. Der Druck aller Messungen betrug 200 MPa.

#### 5.4.10. Tieftemperaturdenaturierung

Bei einem Druck von 200 MPa kann die Temperatur bis zu Werten weit unterhalb des bei Normaldrucks gültigen Gefrierpunkts bei 273 K erfolgen. In dieser Arbeit wurde die Temperatur bis zu 255 K abgesenkt. Dabei entfaltet sich das Protein fast vollständig, dieser reversible Vorgang wird als Tieftemperaturdenaturierung bezeichnet.

Durch die Tieftemperaturdenaturierung ändert sich die Struktur des Proteins *TmCsp* erheblich, dies führt im Wesentlichen zum Verschwinden der meisten Signale durch Entfaltung des Proteins und dem damit verbundenen Anstieg der Austauschraten an den betreffenden Stellen. Einige Resonanzen werden jedoch mit weiter sinkender Temperatur in

eine neue Struktur übergeführt, die den Austausch ebenfalls hindert und damit ein Verschwinden des Signals in den Spektren verhindert. Entsprechend der neuen Struktur ist die Zuordnung der Signale zu bestimmten Aminosäuren nicht bekannt und muss durch Austauschexperimente ermittelt werden. Aufgrund des geringen Probenvolumens und des daraus resultierenden hohen Zeitaufwandes zur Messung konnten diese Experimente bisher nicht durchgeführt werden. Die Signale werden deshalb als „neu 1“ bis „neu 7“ in den Tabellen hier und im Anhang geführt. Diese Signale sind nur in den  $^{13}\text{C}$ -HNCO-Spektren zugeordnet, da diese bedingt durch die Messung mit den neuen Saphirzellen qualitativ höherwertig, als die zuvor gemessenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren sind. Eine Reihe von 2D-HNCO-Spektren bei verschiedenen Temperaturen und einem Druck von 200 MPa zeigt Abb.5.27. Die auf Eins normierten Signalvolumina, dieser sieben neu entstandenen Signale, sind in Abb.5.26. und Tab.5.6. dargestellt.

In den Abb.5.24, und Abb.5.25. sind die linearen gegen die quadratischen Koeffizienten der Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen der  $\text{H}^{\text{N}}$ - und  $^{13}\text{C}^{\alpha}$ -Signale in gleicher Weise wie in den vorangegangenen Darstellungen aufgetragen. An der breiten Streuung ist ersichtlich, dass es sich um Signale von Aminosäuren in einer gefalteten Struktur handelt. Insbesondere fällt auf, dass die Streuung sogar noch erheblich größer ist, als dies bei der nativen Faltung der Fall ist. Dieses Resultat spiegelt den extremen Zustand wider, in dem sich das Protein unter den Bedingungen der Tieftemperaturdenaturierung befindet. Da die Daten in der Kelvin-Temperaturskala wieder zu einer Diagonalen entartet sind, werden die Daten auch in der Temperaturskala  $T^*$  gezeigt. Um einen Vergleich mit der nativen Struktur zu ermöglichen, werden auch diese Daten in gleicher Skalierung wie die Tieftemperaturdenaturierungsdaten noch einmal gezeigt.

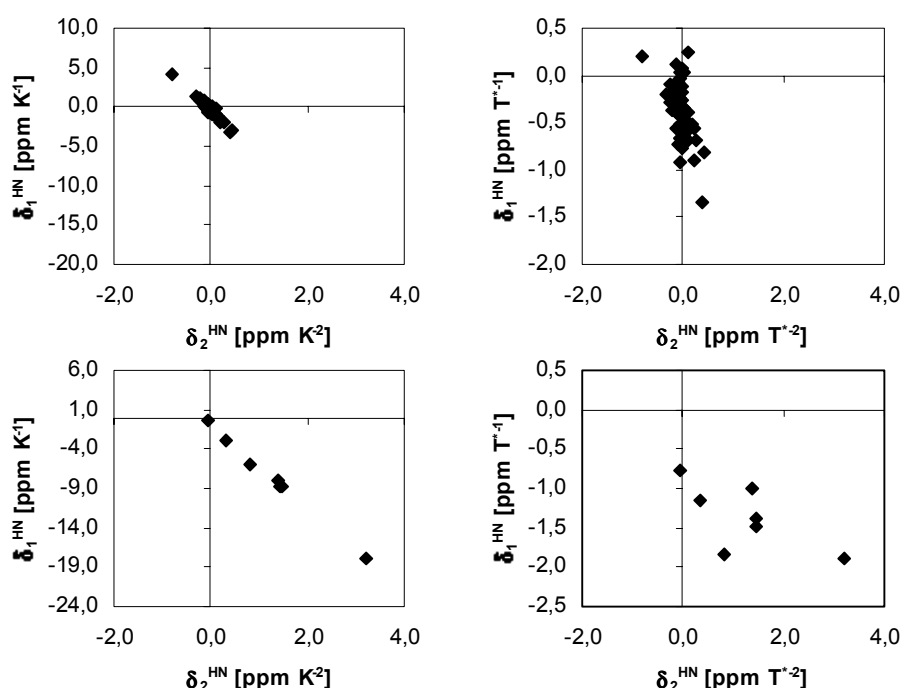


Abb.5.24. Links: Auftragung der quadratischen gegen die linearen Temperaturkoeffizienten der  $\text{H}^{\text{N}}$ -Signale für  $T = 255 - 333 \text{ K}$  und  $p = 200 \text{ MPa}$ . Rechts: die gleichen Daten skaliert auf das Intervall  $T^* = 0 - 1$ . Die obere Reihe zeigt die Resonanzen des nativen *TmCsp*, die untere Reihe die neu entstandenen Resonanzen des kälte-denaturierten *TmCsp*.

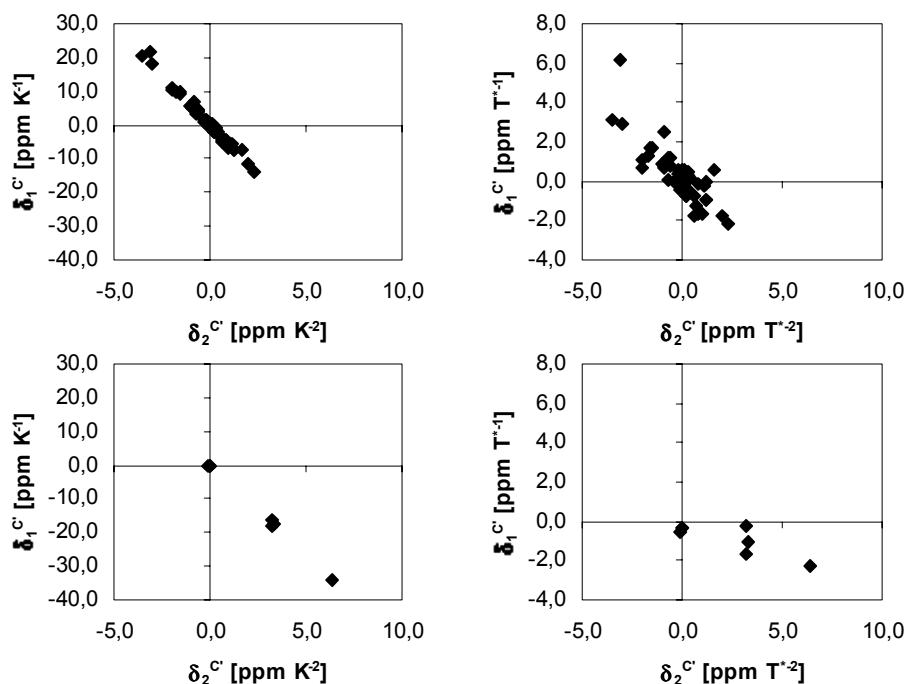


Abb.5.25. Links: Auftragung der quadratischen gegen die linearen Temperaturkoeffizienten der  $^{13}\text{C}'$ -Signale für  $T = 255 - 333$  K und  $p = 200$  MPa. Rechts: die gleichen Daten skaliert auf das Intervall  $T^* = 0 - 1$ . Die obere Reihe zeigt die Resonanzen des nativen *TmCsp*, die untere Reihe die neu entstandenen Resonanzen des kältedenaturierten *TmCsp*.

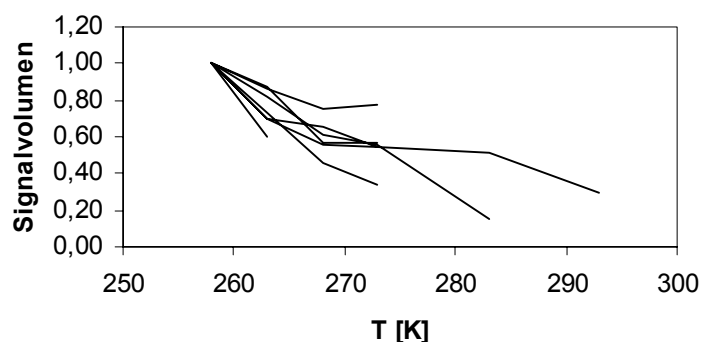


Abb.5.26. Graphische Darstellung der Signalvolumina der bei der Tieftemperaturdenaturierung neu entstehenden Signale in den *TmCsp* Spektren bei 200 MPa. Die Signalvolumina sind auf die Signale im Spektrum bei 258 K normiert. Die einzelnen Datenpunkte sind in Tab.5.6. aufgelistet.

Signal	258 K	263 K	268 K	273 K	283 K	293 K
neu 1	1,00	0,82	0,61	0,56	0,15	
neu 2	1,00	0,73	0,46	0,34		
neu 3	1,00	0,86	0,75	0,77		
neu 4	1,00	0,70	0,65	0,55		
neu 5	1,00	0,87	0,57	0,57		
neu 6	1,00	0,60				
neu 7	1,00	0,70	0,56	0,55	0,51	0,30

Tab.5.6. Die Signalvolumina der durch Kältedenaturierung bei 200 MPa neu entstehenden Signale in den *TmCsp* Spektren nehmen mit fallender Temperatur zu.

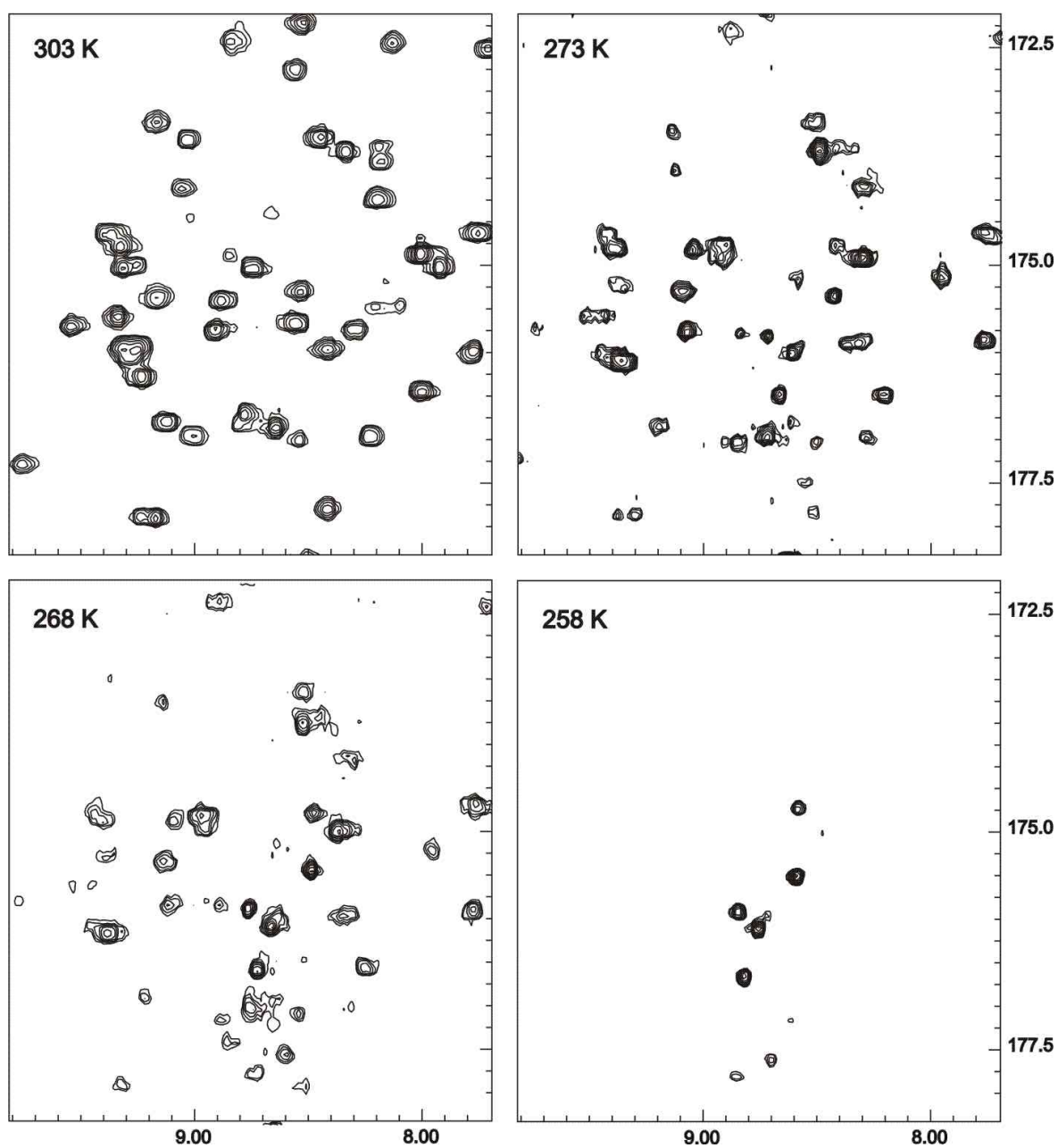


Abb.5.27. HNCO-Spektren von *TmCsp* bei 200 MPa und verschiedenen Temperaturen. Die meisten Signale verschwinden, einige entstehen durch Einstellung einer anderen Konformation neu.



### 5.4.11. Einfluss von Druck auf die Signalvolumina

Durch Vergleich der Signalvolumina mehrerer NMR-Spektren können Verschiebungen des Gleichgewichts zwischen verschiedenen Konformationen eines Proteins beobachtet werden und über die van't Hoff Relation (Gl.5.3.) in Änderungen der Gibbs'schen freien Enthalpie umgerechnet werden. Eine exakte Messung der Signalvolumina ist jedoch sehr schwierig, da diese neben den Gleichgewichtsverschiebungen von vielen Parametern abhängen.

Mit Variation von Druck und Temperatur verändern sich die Signalvolumina aufgrund veränderter  $T_1$ - und  $T_2$ -Relaxation, bedingt durch die strukturellen Änderungen des Proteins, aber auch durch die stark druck- und temperaturabhängigen Viskositätseigenschaften des Wassers. Zusätzliche Störgrößen sind die Feinabstimmung des Probenkopfes im Spektrometer, sowie das Shimmen des Magnetfeldes, um möglichst schmale Linien zu erreichen. Durch begrenzt zur Verfügung stehende Messzeit am Spektrometer, ist es bei umfangreichen Messreihen selten möglich alle Messungen direkt hintereinander durchzuführen, sodass zwischen den Teilmessungen zwangsläufig, allein durch die Einstellung des Spektrometers, Unterschiede in den Signalvolumina auftreten. Auch die Auswertung der Signalvolumina selbst, mit Hilfe der Programme XWinNMR (Bruker) zur Phasierung und Korrektur der Basislinien, sowie die automatische Integration der vielfach überlappenden Signale durch das Programm AUREMOL (Ganslmeier et al. in Vorbereitung), birgt diverse Möglichkeiten zu Abweichungen der Signalvolumina zwischen den Spektren.

Betrachtet man die Änderung der Signalvolumina  $\Delta V$  der Messreihen von *TmCsp* (Abb.5.28.) bei Druckvariationen von 0,1 bis 200 MPa bei 303 K, so ist nur für wenige Aminosäuren eine signifikante Änderung des Volumens feststellbar. Der Mittelwert der linearen Koeffizienten der Signalvolumenänderung ist Null. Die hohe Stabilität des Proteins *TmCsp* macht sich auch hier wieder bemerkbar. Im Gegensatz zu *TmCsp* wurden von Inoue et al. (2000) Teildenaturierungen am Protein RalGDS bei Applikation von Druck beobachtet, dies ist jedoch in Anbetracht der wesentlich differenzierteren Struktur mit zwei  $\alpha$ -Helices und einem  $\beta$ -Faltblatt, bestehend aus fünf gegeneinander verschränkten  $\beta$ -Strängen, im Vergleich zur Monotonie der  $\beta$ -Fasstruktur von *TmCsp* verständlich.

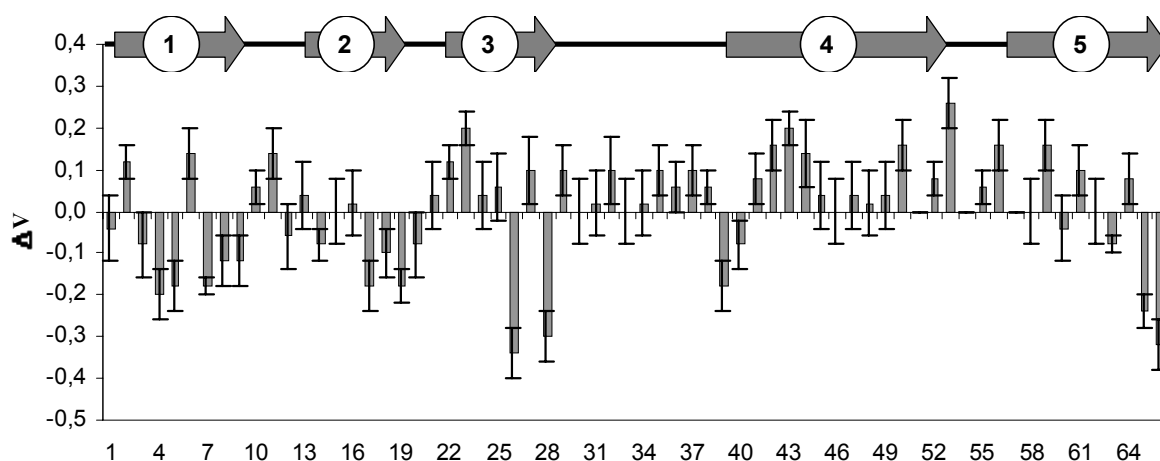


Abb.5.28. Die linearen Änderungen  $\Delta V$  der Signalvolumina von *TmCsp* bei 303 K im Bereich von Normaldruck bis 200 MPa. Alle Aufnahmeparameter wie z.B. Anzahl der Messungen Verstärkungsfaktor wurden während der Druckmessreihen konstant gehalten. Für einige Signale ist die Zu- oder Abnahme des Signalvolumens signifikant.

Da die Änderung der Signalvolumina nach Gl.5.3. und Gl.5.8. mit einer Volumenänderung des Systems Lösungsmittel - Protein erklärt werden können, ist es naheliegend die Positionen maximaler Änderung des Signalvolumens mit den in *TmCsp* enthaltenen hydrophoben Kavitäten zu korrelieren. Analog zur Vorgehensweise von Kalbitzer et al. (2000) am Protein *HPr*, wurden die Kavitäten mit dem Programm MolMol basierend auf der *TmCsp*-Struktur von Kremer et al. (2001) berechnet. Die Volumina der drei aufgefundenen Kavitäten sind in Tab.5.7. dargestellt. Zur Berechnung tastet das Programm die Proteinoberfläche mit einer Kugel ab. Das Ergebnis der Berechnung ist abhängig vom Radius der Testkugel. Sinnvoll sind Werte mit dem Van der Waals Radius eines Protons (1,2 Å). Mit einem Radius der Testkugel von 1,2 Å findet man drei Kavitäten (Tab.5.7.). Im Folgenden wird anhand der Messdaten untersucht, ob steigender Druck zu einer Hydratisierung der bei Normaldruck wasserfreien Kavitäten führen kann.

Kavität	Oberfläche [Å <sup>2</sup> ]	Volumen [Å <sup>3</sup> ]
grün	35,0	17,5
gelb	37,4	19,5
blau	17,9	6,9
Protein+Kavitäten	3980,5	7942,9

Tab.5.7. Volumina der fünf hydrophoben Kavitäten in *TmCsp*, berechnet mit MolMol.

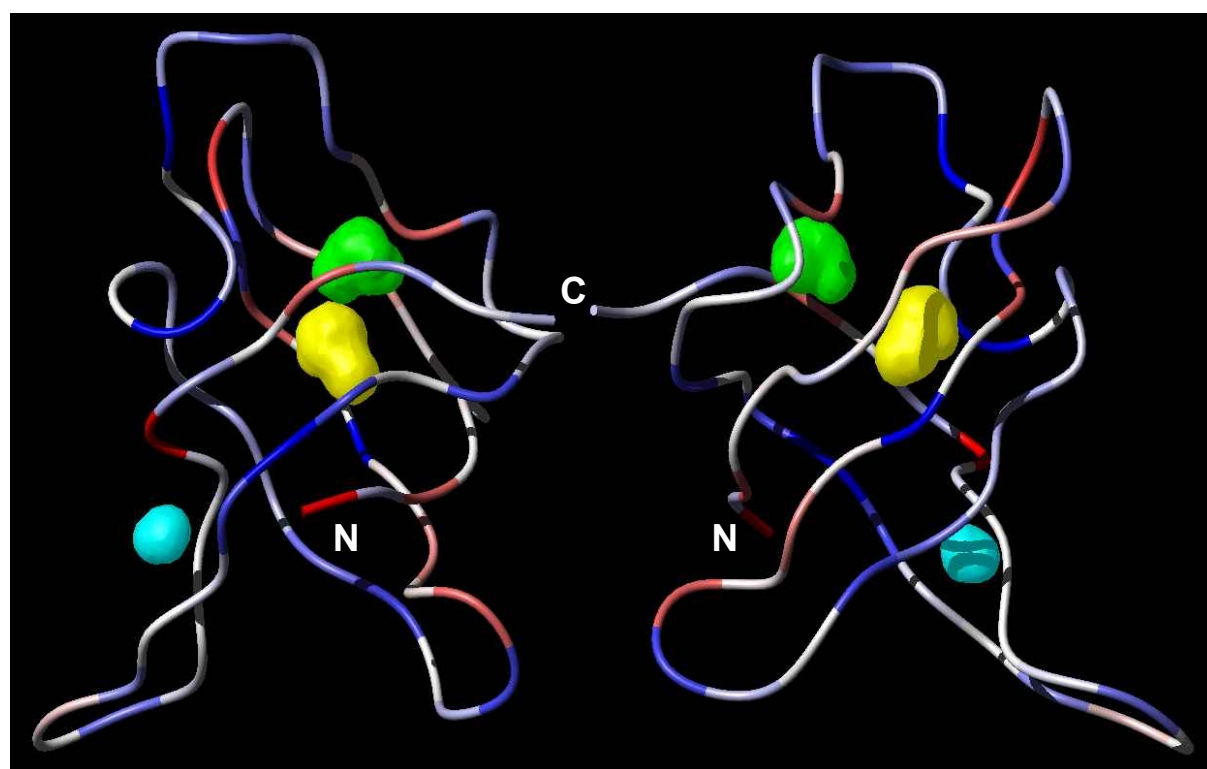


Abb.5.29. Zwei Ansichten der mit MolMol berechneten hydrophoben Kavitäten in *TmCsp*. Zur Orientierung sind C- und N-Terminus eingezeichnet. Die Farben repräsentieren die linearen Koeffizienten  $V_1$  des linearen Polynoms zur Näherung der Änderung des Signalvolumens mit steigendem Druck (siehe Abb.5.28). Zonen negativer Änderungen des Signalvolumens sind blau gefärbt, positive rot, weiße oder helle Bereiche zeigen keine bzw. geringe Druckabhängigkeiten

Wie aus den Darstellungen des Proteinrückgrats in Abb.5.29. zu erkennen ist, zeigen sich keine signifikanten Zusammenhänge der Druckabhängigkeit zur Position der Kavitäten. Auch dies ist wieder ein Beleg für die extreme Stabilität des Proteins *TmCsp*, moderate Änderungen sind zwar zu verzeichnen, verteilen sich aber gleichmäßig über die gesamte Länge des Proteinrückgrats. Betrachtet man die alternierende Sequenz positiver und negativer Druckabhängigkeiten, scheint die Stabilisierung durch gegenseitige Kompensation benachbarter Aminosäuren bedingt zu sein, instabile Bereiche können so nicht entstehen. Die frei liegende Region der längsten Schleife von *TmCsp* zeigt durchgängig positive Werte der Signalvolumenzunahme, dies ist konform zu den Angaben von Heremans (1998) eines positiven Druckkoeffizienten freier Aminosäuren.

#### 5.4.12. Einfluss der Temperatur auf die Signalvolumina

Wie schon bei den chemischen Verschiebungen zu beobachten war, sind auch hier nennenswerte Änderungen nur bei Variation der Temperatur zu verzeichnen.

Zur Abschätzung der Signifikanz der Messungen der Signalvolumina wurde in den 1D-<sup>1</sup>H-Spektren, die zur Kalibrierung jeweils vor den HSQC- und 2D-HNCO-Spektren aufgenommen wurden, das Integral des Signalbereichs zu negativen chemischen Verschiebungen hin in Abhängigkeit der Temperatur betrachtet. Dieser Anteil der 1D-Spektren, rechts des DSS-Referenzsignals, enthält ausschließlich Signale, die aus gefalteten Strukturen herrühren. Ungefaltete Proteine, wie z.B. die Tetrapeptide zeigen hier keine Signale. Bei Denaturierung verschwinden diese Signale vollständig. Vergleicht man diese Signale mit dem Verlauf der Intensitäten einer Aminosäure, so erhält man aus den Abweichungen des Verlaufs Informationen, inwieweit Relaxationsprozesse und Ungenauigkeiten bei der Einstellung des Spektrometers sich auf das Volumen einzelner

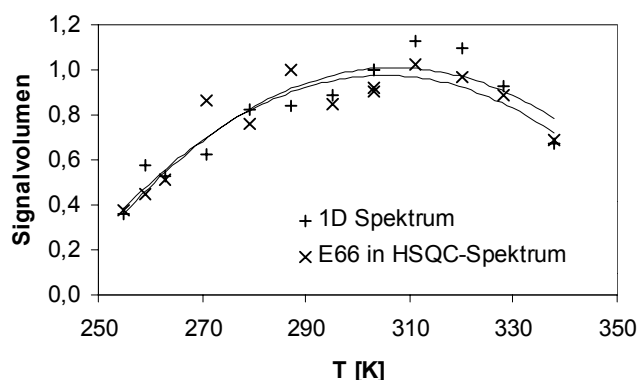


Abb.5.30. Das Signalvolumen gefalteter Bereiche im 1D-Spektrum, verhält sich bei Variation der Temperatur ähnlich wie Signale einzelner Aminosäuren in den HSQC Spektren

Signale auswirken. Als Beispiel zeigt Abb.5.30. den Verlauf von E66 im Vergleich zum Verlauf des Signalbereichs rechts des DSS-Referenzsignals im 1D-Spektrum. Beide Kurven verhalten sich ähnlich, folglich wird das Verhalten weitgehend durch Effekte der temperaturinduzierten Denaturierung dominiert.

In Tab.10.23. sind die quadratischen, linearen und konstanten Fitkoeffizienten für den Temperaturbereich 255 K bis 339 K und 200 MPa auf Basis diverser <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC Spektren zu finden. Nahezu bei allen Aminosäuren in *TmCsp* zeigte sich ein deutliches Maximum, entsprechend dem in Abb.5.30. gezeigten Maximum von E66. Dieses Verhalten ist vergleichbar der Stabilitätskurve von Proteinen aus Abb.5.2. rechts. Ähnliche Kurven wurden von Welker (1999) bei Circular dichroismmessungen der Denaturierung von *TmCsp* mit Guanidiniumhydrochlorid gefunden. Berechnet man aus den quadratischen Polynomen der Näherungen des Signalvolumens die Temperaturen  $T_{max}$  des Maximums, so erhält man die in Tab.10.24. aufgeführten Werte. In Tab.10.24. sind diese Temperaturen für die Druckstufen 0,1 / 50 / 100 / 150 / 200 MPa zu finden. Die berechneten Temperaturen bei den Druckstufen unter 200 MPa erstrecken sich, wegen des Gefrierpunktes von Wasser, nur auf den Temperaturbereich

276 K bis 339 K. Korreliert man diese Daten mit den Austauschraten  $R_B$  nach Bai und Englander (1993), sowie den qualitativen Austauschdaten  $R_K$  von Kremer et al. (2001) (Tab.10.20), fallen die hohen linearen Abhängigkeiten mit der Lage der  $\beta$ -Stränge (57%) und den von Kremer et al. (2001) qualitativ gegebenen Austauschraten (-54%) auf. Bildet man die Mittelwerte der Temperaturen, separiert nach Position im  $\beta$ -Strang oder Schleife, so findet man eine signifikant höhere Maximumtemperatur in den  $\beta$ -Strängen, als in den offenen Schleifenregionen. Die Standardabweichung gemittelt über alle Druckstufen beträgt 3 K. Der Unterschied der mittleren Temperaturen maximaler Stabilität von 314 K in den  $\beta$ -Strängen und 299 K in den Schleifenregionen liegt damit außerhalb der Fehlergrenzen. Eine moderate Reduktion der Stabilität ist auch bei steigendem Druck beobachtbar, liegt jedoch innerhalb der Fehlergrenzen. Die 200 MPa Werte basieren auf mehr Stützstellen als die darunter liegenden Druckstufen, sodass hier die Mittelwerte der Temperaturen maximaler Stabilität von den übrigen Werten etwas abweichen (Tab.10.24.).

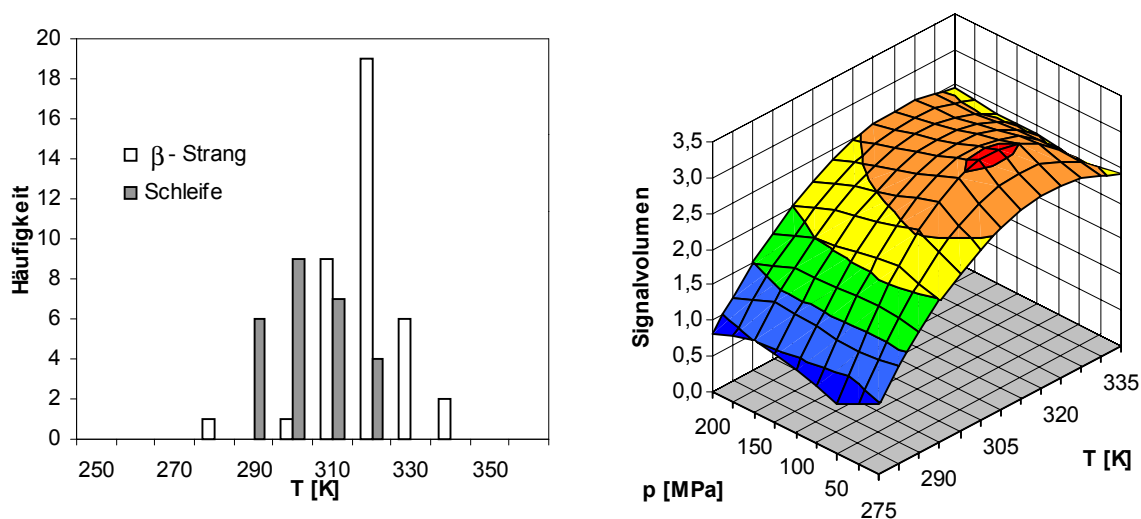


Abb.5.31. Links: Histogramm der Temperaturen maximalen Signalvolumens gemittelt über alle Druckstufen von 0,1 bis 200 MPa. Rechts: Druck und Temperaturabhängigkeit des Signalvolumens am Beispiel von V65 in  $TmC_{sp}$ .

In Abb.5.31. links findet man ein Histogramm der Temperaturen der maximalen Signalvolumina gemittelt über die Druckstufen von 0,1 MPa bis 200 MPa. Wie der Grafik zu entnehmen ist, liegen die Temperaturen in den rigiden  $\beta$ -Strängen im Mittel höher und streuen weniger als in den Schleifenregionen.

Das Diagramm in Abb.5.31. rechts kann näherungsweise als ein Stabilitätsdiagramm entsprechend der qualitativen Darstellung in Abb.5.2. interpretiert werden. Dabei sind jedoch die, bereits oben erwähnten, Ungenauigkeiten und Störgrößen bei der Messung zu berücksichtigen. Der Überhöhung bei der Druckstufe von 150 MPa sollte daher keine Bedeutung zugebilligt werden, da signifikante druckinduzierte nichtlineare Variationen der Signalvolumina bei  $TmC_{sp}$  nicht aufgefunden wurden.

### 5.4.13. Einzelbetrachtung einiger Aminosäuren

Obgleich *TmCsp* durch seine hohe innere Stabilität keine gravierenden Änderungen zeigt, sind dennoch einige Aminosäuren vorhanden, die eine gesonderte Betrachtung verdienen. Die hier gezeigten Effekte offenbaren sich erst durch Variation von Druck und Temperatur. Eine herausragende Stellung nimmt hier die Aminosäure Tryptophan W7 ein, die zum vermuteten reaktiven Zentrum der mRNA-Bindestelle von *TmCsp* (Welker 2000) gehört. Neben W7 existiert noch ein weiteres Tryptophan in *TmCsp* an Position 29, dieses ist jedoch nicht wie W7 in allen *Csp* Proteinen konserviert. Abb.5.32. zeigt das Druck- und Temperaturverhalten von W7, die Protonenverschiebung (linke Abb.) ist ähnlich zu der des W29, dies deutet auf die ähnlichen Struktur der Wasserstoffbrücken hin. Nach den Angaben von Kremer et al. (2001) ist W7 weniger stark in intramolekulare Wasserstoffbrücken gebunden als W29, da W7 aber eine weniger starke Druckabhängigkeit zeigt, widerspricht dies den Ausführungen von Li et al. (1998). Hier wird eine stärker ausgeprägte Druckabhängigkeit bei Bindungen zum umgebenden Wasser postuliert als bei intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen. In der Druckabhängigkeit ist zu höheren Temperaturen hin ein weniger starker Abfall bei W7 gegenüber W29 zu erkennen. Dies kann als Anzeichen für besser wirksame Stabilisierungsmechanismen in der Umgebung des funktional bedeutsamen W7 gewertet werden.

Interessant sind die  $^{15}\text{N}^{\epsilon}$ -Verschiebungen, die Auskunft über intramolekulare Abstände und Bindungswinkel geben (Akasaka & Li 1998). Mit zunehmendem Druck invertiert sich die Temperaturabhängigkeit von W7 (Abb.5.32. rechts), während sie sich bei W29 (Abb.5.33. rechts) tendenziell bei hohen wie bei niedrigen Drücken ähnlich verhält. Eine mögliche Interpretation ist eine Schaltfunktion, die die Bindung von RNA ab einer sehr eng definierten Temperaturschwelle, inhibiert bzw. induziert. Diese These kann jedoch nur durch Aggregationsmessungen von *TmCsp* mit RNA erhärtet werden. Ursache des Verhaltens könnte der Zusammenbruch einer größeren hydrophoben Kavität in der Nähe von W7 sein. Dies wäre mit einer Änderung des Signalvolumens verbunden, die jedoch nicht zu beobachten ist (Abb.5.34.). Auch Ringstromeffekte sind bei Tryptophan zu berücksichtigen. Betrachtet man die Lage der Ringe von W7 und F16 in der Struktur (Abb.5.35.links) bei (303 K / 0,1 MPa) und in der Struktur (Abb.5.35.rechts) bei 333 K und 150 MPa, so ist dies auch die wahrscheinlichste Erklärung für das Verhalten.

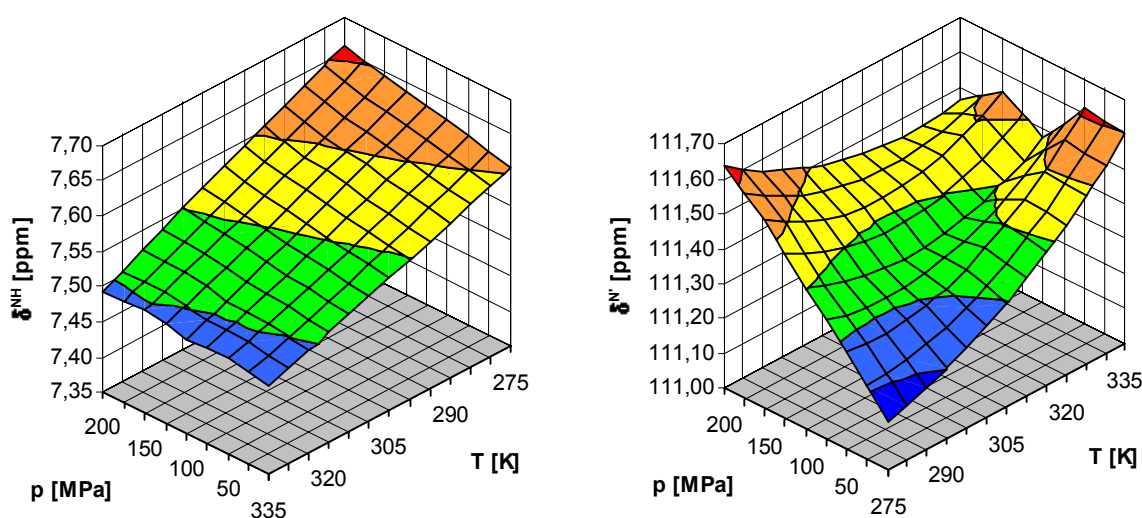


Abb.5.32. Druck und Temperaturabhängigkeit der  $\text{H}^{\text{N}}$ - und  $^{15}\text{N}^{\epsilon}$ -Signale des Tryptophan W7 in *TmCsp*.

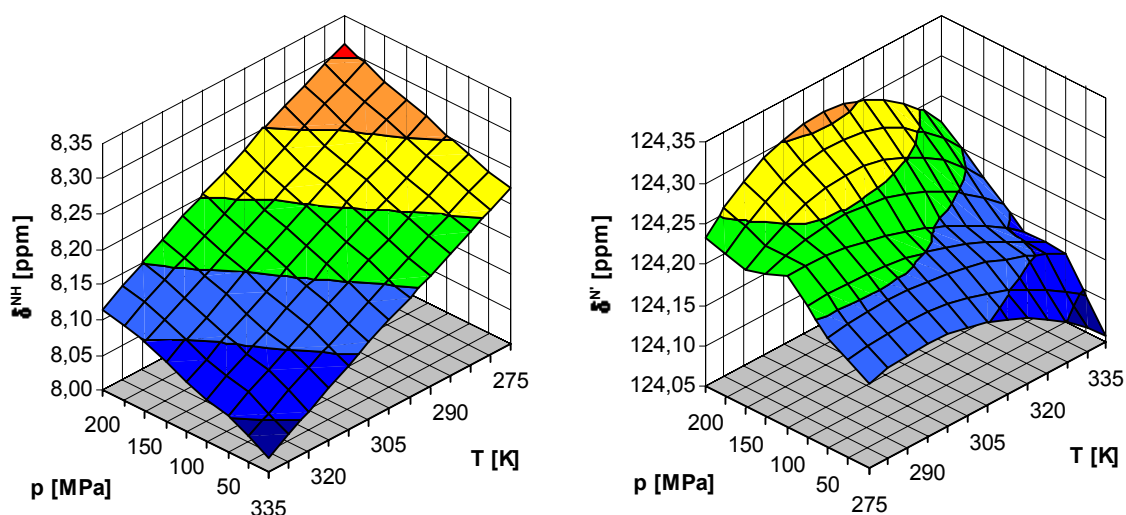


Abb.5.33. Druck und Temperaturabhängigkeit der  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungen des Tryptophan W29 in *TmCsp*.

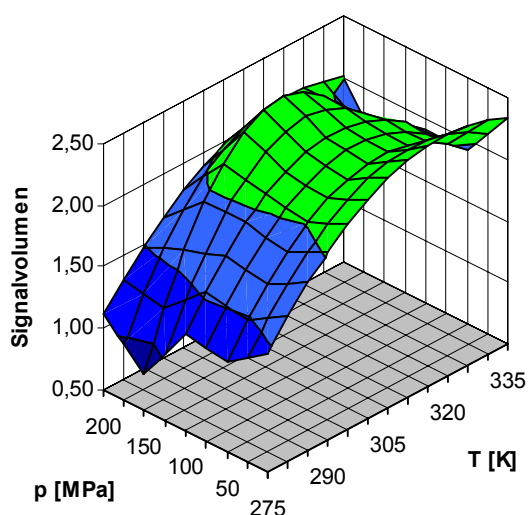


Abb.5.34. Das Signalvolumen von W7 ändert sich nicht wesentlich mit steigendem Druck, obwohl sich die  $^{15}\text{N}$ -Verschiebungen bei hohem und niedrigem Druck gegensätzlich verhalten (Abb.5.32. rechts).

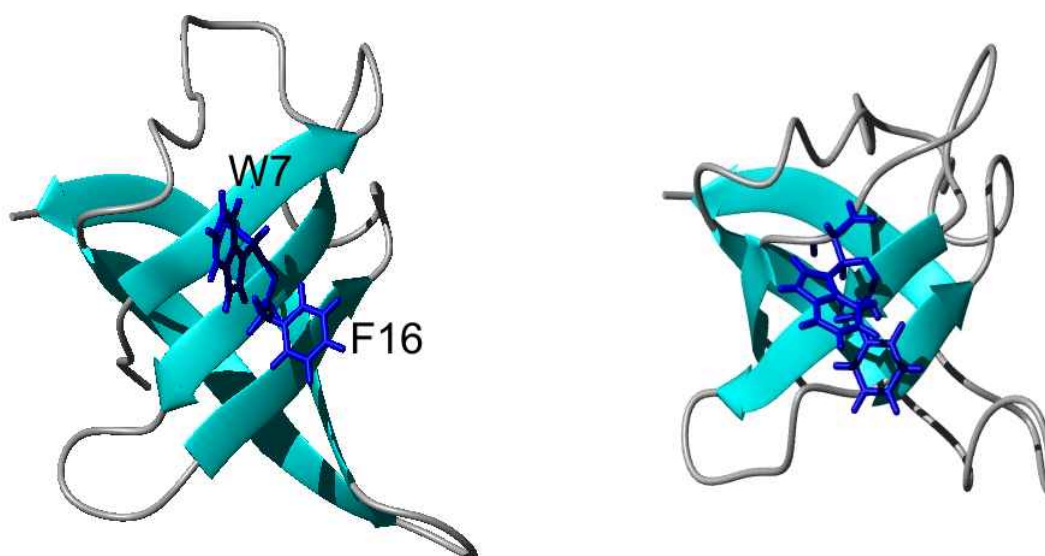


Abb.5.35. Links: Struktur von *TmCsp* bei 303 K und 0,1 MPa. Rechts: Die Struktur von *TmCsp* bei 333 K und 150 MPa. Die Lage der Ringe von W7 und F16 ändert sich zueinander, was die Druck- und Temperatur Effekte der chemischen Verschiebung erklären kann.



Auffallend bei vielen  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Signalen in Abb.5.32. und Abb.5.33. sowie den folgenden Abbildungen ist das qualitativ identische Verhalten. Im Gegensatz dazu steht das sehr differenzierte Verhalten der  $^{15}\text{N}^{\epsilon}$ -Verschiebungen.

Im Vergleich des Verhaltens in Tris/HCl- und Phosphatpuffer fiel Histidin auf. Abb.5.36. zeigt das hoch konservierte in der RNA Bindestelle lokalisierte H28, Abb.5.37. das wenig konservierte H61. Während die temperaturinduzierte Änderung des  $^{15}\text{N}^{\epsilon}$ -Signals von H28 stark nichtlinear ist, zeigt H61 ein nahezu lineares Verhalten Abb.5.37.

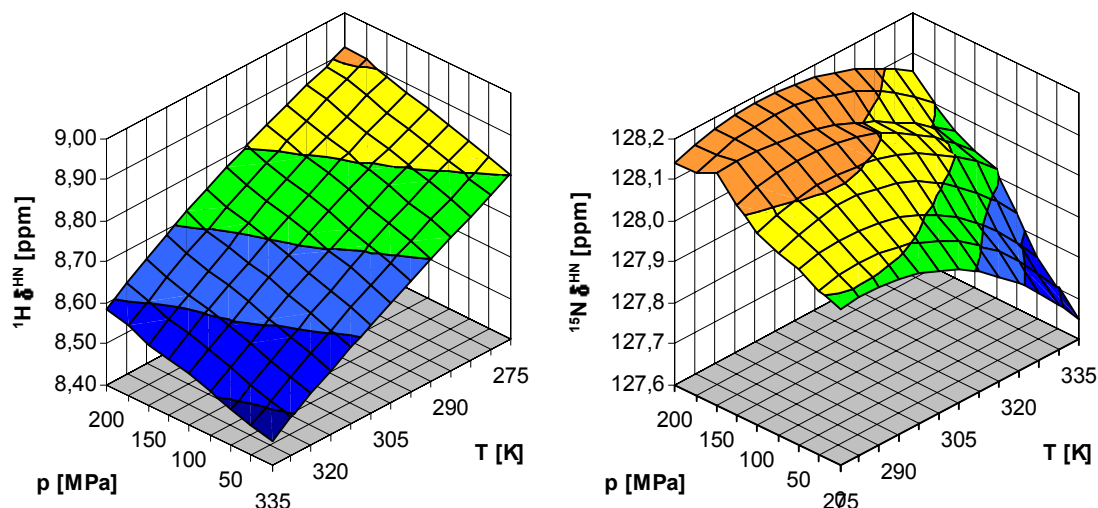


Abb.5.36.  $^1\text{H}^{\text{N}}$ - und  $^{15}\text{N}^{\epsilon}$ - Diagramme von H28, das der RNA Bindestelle des *TmCsp* zugeordnet wird.

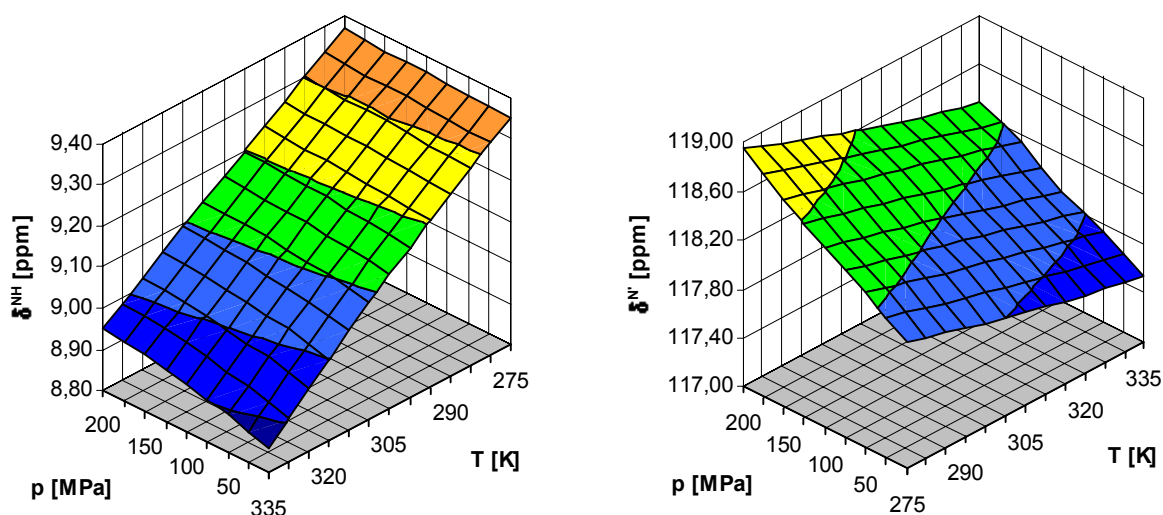


Abb.5.37.  $^1\text{H}^{\text{N}}$ - und  $^{15}\text{N}^{\epsilon}$ - $T,p$  Diagramme von H61, das durch unterschiedliches Verhalten in Tris/HCl- und Phosphatpuffer auffällt.

Ebenfalls zur RNA-Bindestelle des *TmCsp* gehört K11, das sich jedoch auch nicht grundsätzlich von den vorangegangenen Abbildungen unterscheidet (Abb.5.38.). Hier ist das Temperaturverhalten der  $H^N$ -Verschiebungen sehr stark, dies mag durch die Lage in einer Schleifenregion zu erklären sein. Intramolekulare Wasserstoffbrücken werden K11 von Kremer et al. (2001) nicht zugeordnet, die hohe Druck- und Temperaturabhängigkeit ist konform zu den Aussagen von Young et al. (1994), sowie Li et al. (1998), die feststellten, dass Wasserstoffbrücken zum umgebenden Wasser mit besonders hohen Änderungen der chemischen Verschiebungen bei Variation der Umgebungsbedingungen einhergehen. Besonders drastisch zeigt sich dieser Effekt bei R2 (Abb.5.39.), das nach Kremer et al. (2001), sowie nach Bai und Englander (1993) sehr hohe Austauschraten aufweist. Trotz des extremen Austauschverhaltens sind die  $H^N$ - Druck- und Temperaturabhängigkeiten linear.

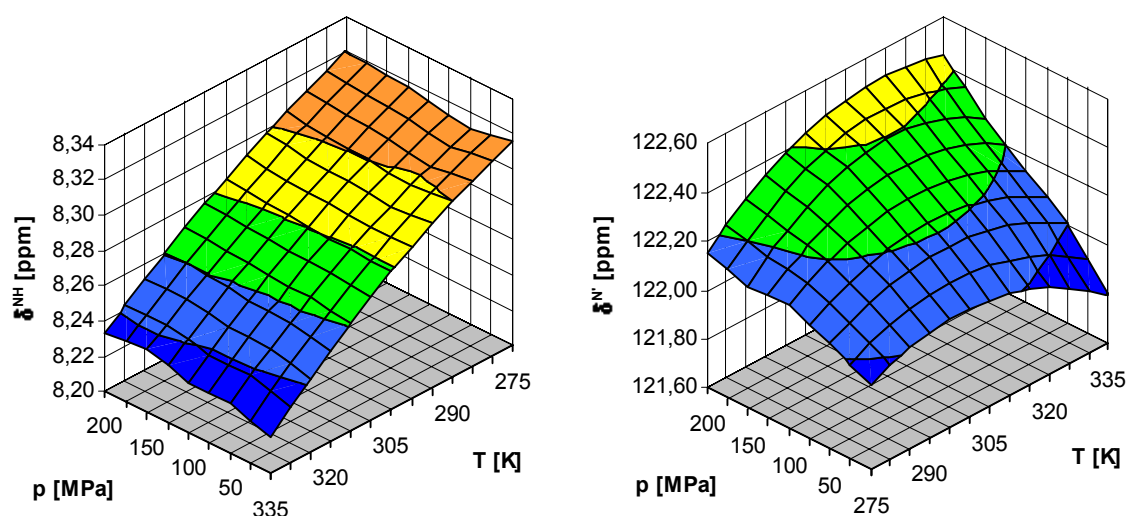


Abb.5.38. Hohe Austauschraten bei K11 korrelieren mit starken Druck- und Temperaturabhängigkeiten der chemischen Verschiebung.

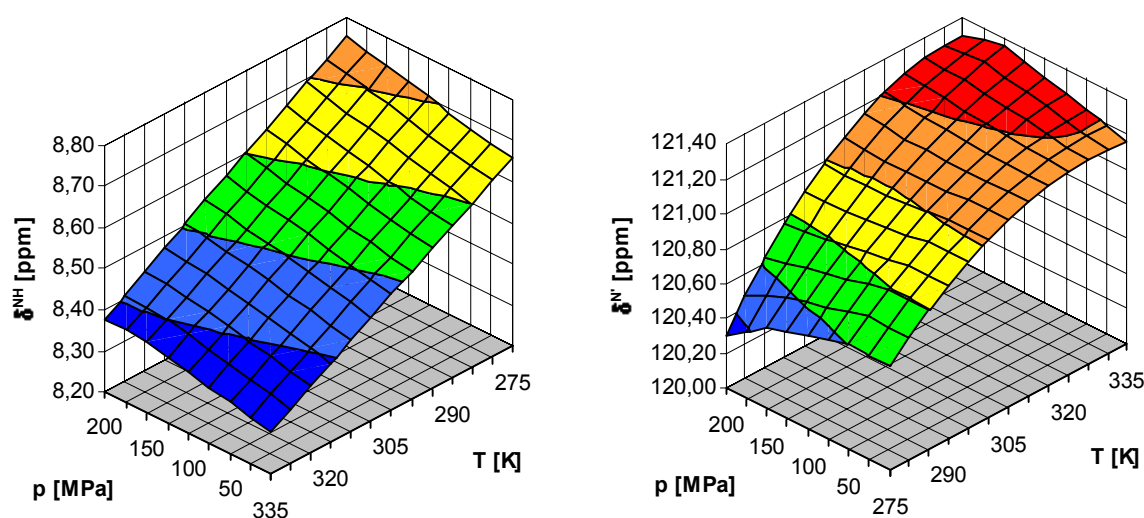


Abb.5.39. Die sehr hohen Austauschraten von R2 resultieren in ebenfalls hohen druck- und temperaturinduzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen.



### 5.5. Druckabhängigkeit der $J$ -Kopplungen

Die  $J$ -Kopplungen sind eine elementare Komponente zur Strukturbestimmung von Proteinen in der NMR. Die  $H^N$ - $H^\alpha$  Kopplungen geben z.B. Auskunft über die dihedrale Winkel im Proteinrückgrat. Hier wurde die  $J^{HN}$ -Kopplung vermessen, die Auskunft über Bindungslänge und Ausrichtung der N-H-Bindung gibt. Die Messung erfolgt durch Weglassen des  $^{15}\text{N}$ -Entkopplungspulses in der HSQC-Pulssequenz. Wegen der Aufspaltung der Signale in indirekter Richtung des Spektrums sind längere Messzeiten von etwa 8 Stunden pro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum notwendig, als bei den vorher besprochenen Spektren mit  $^{15}\text{N}$ -Entkopplung. Die hier gemessenen Daten dienen als Grundlage zum Vergleich mit den Linienaufspaltungen in den orientierenden Medien, daher liegt die Messtemperatur auch bei 333 K.

Die  $J^{HN}$ -Kopplungen in Abhängigkeit des Drucks sind in Tab.10.25. zu finden. Die konstanten ( $J_0$ ), linearen ( $J_1$ ) und quadratischen ( $J_2$ ) Koeffizienten des Polynoms zur Näherung der  $J$ -Kopplungsdaten sind ebenfalls in Tab.10.25. aufgelistet und werden in Abb.5.40. dargestellt.

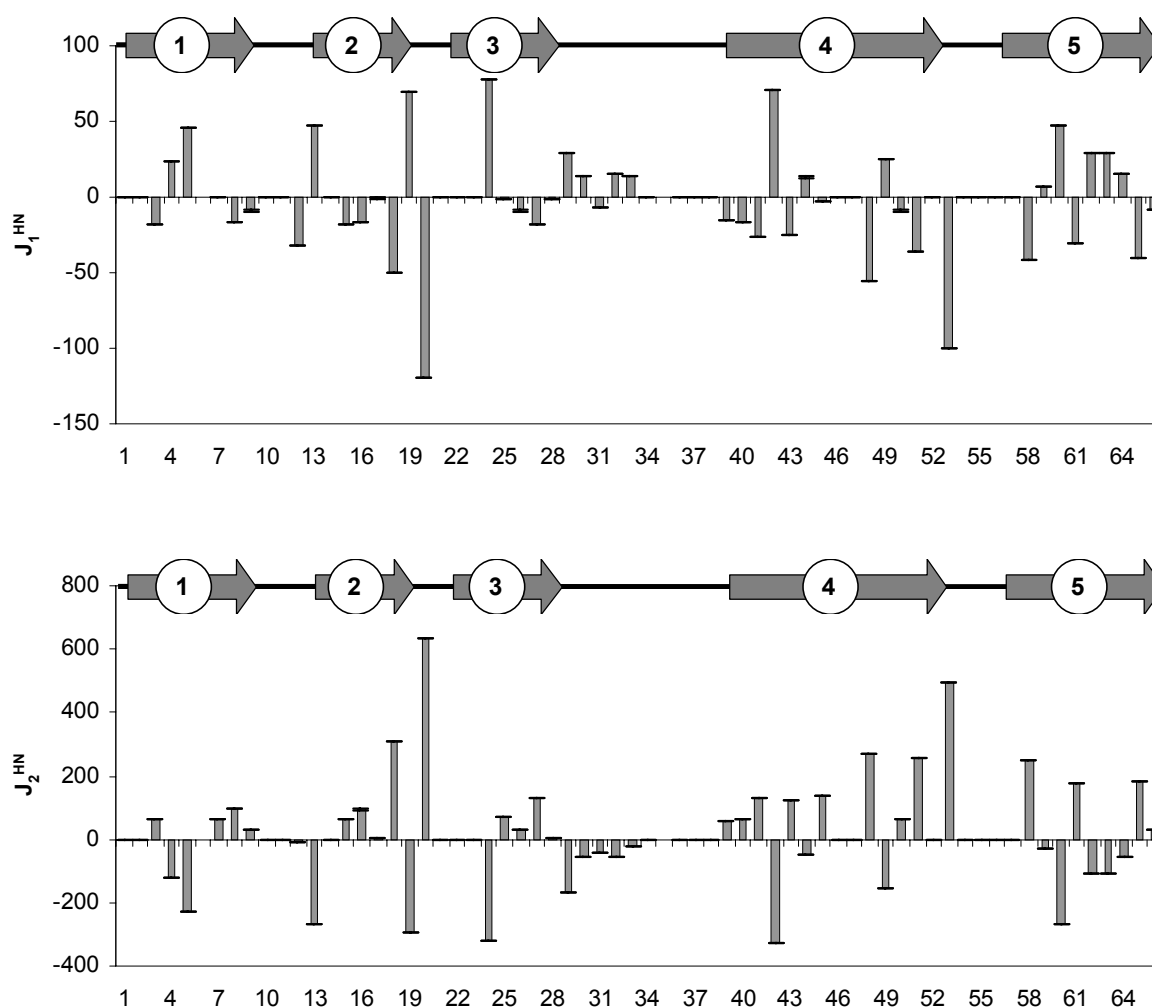


Abb.5.40. Balkendiagramme der linearen (oben) und quadratischen (unten) Koeffizienten des Druckverhaltens der  $J^{HN}$ -Kopplungen von *TmCsp* bei 333 K. Wegen Austauschverbreiterung sind zahlreiche Signale nicht sichtbar.

Wie schon bei den chemischen Verschiebungen praktiziert, werden auch die  $J$ -Kopplungen durch Pearson Korrelation auf lineare Zusammenhänge mit den Daten aus Tab.10.20. geprüft. Die Ergebnisse dieser Korrelationen sind in Tab.5.8. dargestellt. Hohe Korrelationen ergeben sich für die konstanten Koeffizienten  $J_0$  mit den Sekundärstrukturelementen und den Austauschraten nach Bai und Englander (1993) in den  $\beta$ -Strängen. Die konstanten Koeffizienten  $J_0$  entsprechen den  $J^{\text{HN}}$ -Kopplungen bei Normaldruck mit hinreichender Genauigkeit. Damit ist die hohe Korrelation von  $J_0$  verständlich, da die  $J^{\text{HN}}$ -Kopplung Informationen über die Bindungslänge enthält, die durch die Sekundärstruktur beeinflusst wird.

Interessanter sind die Korrelationen der quadratischen und linearen Koeffizienten mit den durch die Aminosäuresequenz bedingten Raten von Bai und Englander, dies zeigt die Kopplung von Druckabhängigkeit und Sequenz des Proteins.

Die Stärke der Wasserstoffbrücken  $E_{\text{OH}}$  zeigt nur geringe Korrelationen zu den  $J^{\text{HN}}$ -Kopplungen, obwohl Wasserstoffbrücken auch die H-N Bindungslänge beeinflussen sollten. Die Korrelation zu -0,37 in den Schleifen sollte nicht überbewertet werden, da insgesamt nur wenig Werte der  $J$ -Kopplungen in den Schleifen gemessen werden konnten.

Pearson Korrelationen								
	ges. <i>TmCsp</i>				$\beta$ -Strang		Schleife	
	S	$R_K$	$R_B$	$E_{\text{OH}}$	$R_B$	$E_{\text{OH}}$	$R_B$	$E_{\text{OH}}$
$J_2$	-0,08	0,00	-0,37	-0,19	-0,02	-0,22	0,00	-0,37
$J_1$	0,14	-0,05	0,38	0,14	0,00	0,18	-0,05	0,38
$J_0$	-0,49	0,39	0,00	0,29	0,46	0,18	0,27	0,00

Tab.5.8. Die Daten der Korrelationen von konstanten ( $J_0$ ), linearen ( $J_1$ ) und quadratischen ( $J_2$ ) Koeffizienten der  $J$ -Kopplung mit den Austauschraten ( $R_B$ ) nach Bai und Englander (1993), den Austauschraten ( $R_K$ ) nach den qualitativen Angaben von Kremer et al.(2001), sowie der Stärke der Wasserstoffbrücken ( $E_{\text{OH}}$ ) berechnet nach den Strukturdaten von *TmCsp* mit Hilfe des Programms AURELIA (Neidig et al. 1995)

## 6. Hochdruckmessungen residualer Dipolkopplungen

Die Proteinstrukturbestimmung mittels NMR basiert in der Regel auf Messungen von NOE-Kontakten in NOESY-Spektren. Die NOE-Kreuzsignale zwischen zwei Spins 1 und 2 sind jedoch sehr schwach und verschwinden im höheren Temperaturbereich oft gänzlich wegen der Auslöschung der beiden Terme der Spektraldichtefunktionen  $J(\omega)$  in der Gleichung der Kreuzrelaxationsrate  $\sigma$  Gl.6.1.. Die Kreuzrelaxationsrate ist aufgrund der  $r^{-6}$  Abhängigkeit der entscheidende Faktor für die Entfernungsbestimmung interatomarer Abstände durch die NMR. Eine Messung ist mit den reduzierten Probenvolumina in den Hochdruckzellen schwer möglich, auch mit den neuen Saphirzellen ist kein angemessenes Signal zu Rauschverhältnis erreichbar.

$$\sigma \propto \frac{1}{r^6} \{6J(\omega_1 + \omega_2) - J(\omega_1 - \omega_2)\} \quad (\text{Gl.6.1.})$$

Um die vorhandenen Daten der chemischen Verschiebungen von *TmCsp* unter Hochdruck um Daten zur Bestimmung einer Struktur zu ergänzen, ist es unumgänglich andere Methoden wie die Messung der residualen Dipolkopplungen zu wählen. Die Restdipolkopplung  $\langle D_{12} \rangle$  zweier Spins 1 und 2 ist gegeben durch Gl.6.2. (Brunner 2001b), die Winkel  $\vartheta$  und  $\varphi$  definieren darin die Lage des Kernverbindungsvektors relativ zum Hauptachsensystem des molekularen Orientierungstensors  $S_{ij}$ . Die Hauptwerte  $S_{xx}$ ,  $S_{yy}$ ,  $S_{zz}$ , dieser von Saupe (1964) eingeführten Ordnungsmatrix, sind im Falle isotroper Rotation des Moleküls alle gleich 0. Saupe verwendete den Formalismus der Restdipolkopplungen zur Strukturbestimmung kleiner organischer Verbindungen, die in sich weitgehend starr sind. Zur Variation der Struktur steht diesen Molekülen nur die Rotation einzelner Gruppen um Einfachbindungen offen. Für Proteine ist die Annahme eines in sich starren Systems eine starke Vereinfachung, die nicht zwangsläufig erfüllt sein muss.

$$\langle D_{12} \rangle = -D_{12} S_{zz} S \left( \left( \frac{3}{2} \cos^2 \vartheta - \frac{1}{2} \right) + \frac{\eta}{2} \sin^2 \vartheta \cos 2\varphi \right) \quad (\text{Gl.6.2.})$$

$D_{12}$  ist die statische Dipolkopplungskonstante, abhängig von den gyromagnetischen Verhältnissen und dem Abstand der beiden Kerne (Gl.6.2.)

In  $J$ -gekoppelten Systemen zweier Spins 1 und 2 addiert sich die Restdipolkopplung zur isotropen Kopplungskonstante  $J$  (Brunner 2001b).

Restdipolkopplungen können gemessen werden, sobald die isotrope Rotation der Moleküle eine anisotrope Bevorzugung bestimmter Rotationsmoden relativ zum äußeren Magnetfeld erfährt. Die Ausrichtung wird beispielsweise durch eine direkte Wechselwirkung des Moleküls mit dem Magnetfeld (Bothner-By 1996), Wechselwirkungen mit elektrischen Gleich- und Wechselfeldern (Riley & Augustine 2000, Peshkovsky & Dermott 2000), oder durch orientierende Medien, die der Lösung zugesetzt werden (Bax & Tjandra 1997), erreicht. Als orientierende Medien sind flüssigkristalline Stoffe geeignet, die sich im Magnetfeld von der isotropen in die nematische Phase umwandeln und dabei Flächen ausbilden, die durch sterische, hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkung die isotrope Rotation der gelösten Proteine beeinflussen und dadurch in eine partiell ausgerichtete Bewegung überführen. In dieser Arbeit wurden zur Orientierung des Proteins *TmCsp* Mischungen kurz und langkettiger Phospholipide, die sogenannte Bicellen bilden (*bilayered micells*) (Sanders & Landis 1995), verwendet. Eine schematische Darstellung der scheibenförmigen Phospholipidbicellen ist in Abb.6.1. zu finden. Die kurzkettige Komponente DHPC (Dihexanoyl Phosphatidylcholin) formt die Kanten der Bicellen, während die längere Komponente DMPC (Dimyristoylphosphatidylcholin) eine zweilagige Phospholipidschicht

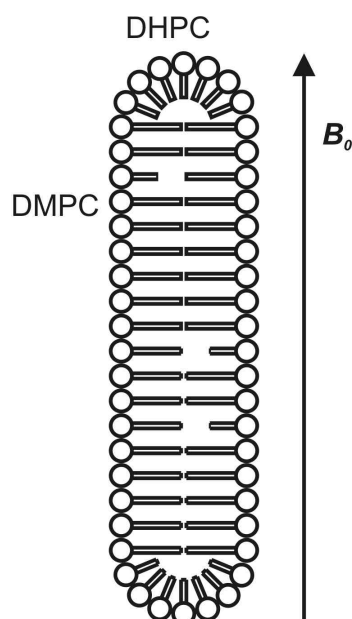


Abb.6.1. DMPC/DHPC Phospholipid-Bicelle im Magnetfeld. (modifiziert. nach Brunner 2001)

ausbildet. Das Mischungsverhältnis DMPC:DHPC muss sich nach Angaben von Ottiger und Bax (1998) im Bereich von  $q = 3,0 - 3,5$  bewegen und bestimmt neben dem pH der Lösung den Temperaturbereich von 300 - 320K in dem die nematische Phase auftritt. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass auch bei weit höheren Temperaturen noch eine orientierende Phase vorhanden ist. Wesentliche Ursache dieser erhöhten Temperaturstabilität dürfte die Zugabe von 3 % CTAB ((Cetyl) Trimethyl Ammonium Bromid) (Losonczi & Prestegard 1998) sein, das in der Arbeit von Ottiger nicht beschrieben wurde. Neben diesen Lipiden sind noch andere Mischungen für Messungen bei niedrigen pH Werten (Cavagnero et al. 1999) oder in erweitertem Temperaturbereich von 283 bis 333K (Wang et al. 1998) bekannt. Auch Tabakmosaikviren *TMV*, Fragmente aus der Retina von Rindern, oder gestreckte Polyacrylamid-Fasern können in nematischer Phase im Magnetfeld auftreten und sind damit als orientierende Medien geeignet (Brunner 2001b).

Wie schon bei Puffern und Referenzsubstanzen erwähnt, besteht auch hier die potentielle Gefahr einer Aggregatbildung von orientierendem Medium und zu vermessendem Protein. Für das hier verwendete Phospholipidbicellensystem DMPC/DHPC wurde die Verträglichkeit mit *TmCsp* von

Bamann (2001) überprüft.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst die Druckstabilität der Phospholipide nachgewiesen, anschließend werden einige Messergebnisse der Restdipolkopplungen an *TmCsp* vorgestellt und deren Eignung zur Bestimmung einer Hochdruckstruktur bei 333 K und 150 MPa diskutiert.

## 6.1.Materialien und Methoden

### 6.1.1. Vorbereitung der Proben

Die verwendete Lipidmischung entsprach der von Ottiger & Bax (1998) beschriebenen Zusammensetzung aus den Phospholipiden DMPC (Dimyristoylphosphatidylcholin) und DHPC (Dihexanoylphosphatidylcholin) von Larodan Fine Chemicals, Malmö, Schweden. Eine Phasentrennung des Systems wurde durch Zugabe von CTAB (Hexadecyl(cetyl)-trimethylammoniumbromid) von FLUKA, Chemie AG, nach der Beschreibung von (Losonczi & Prestegard 1998) verhindert. Das Massenverhältnis DMPC:DHPC:CTAB war 3:1:0,1. Es wurden Messreihen mit 9 Massenprozent und 5 Massenprozent Lipid durchgeführt. Um realistische Bedingungen zu erhalten, wurde für die Messungen der Druck- und Temperaturstabilität 1 mM *BPTI* zugesetzt, das in den Messungen der Restdipolkopplungen durch *TmCsp* ersetzt wurde.

## 6.2. NMR-Messtechnik

Die Messungen zur Druck und Temperaturstabilität der Phospholipidmischungen wurden am Bruker DMX 500 Spektrometer mit 5 mm Borosilikatglaskapillaren durchgeführt. Der verwendete Probenkopf war ein 10 mm Protonenmesskopf, über dessen Lockspule die Aufspaltung des Deuteriumsignals, zum Nachweis der nematischen Phase des Systems, gemessen wurde.

Die Messungen der Restdipolkopplungen von *TmCsp* erfolgten am Bruker DRX 600 Spektrometer mit einem 8 mm Tripelresonanzkopf.

Die Drift des Hauptmagneten wurde durch Nachführung des Feldes auf das D<sub>2</sub>O Locksignal kompensiert. Die Aufspaltung des Signals bereitete beim Lock keine Schwierigkeiten, das System blieb stabil auf einer der beiden Linien des Deuteriumdoublets stehen.

Die Auflösung der <sup>2</sup>H-1D-Spektren betrug in der Regel 16 kByte, mit 16 Scans bei etwa 5 min. Messzeit. Die <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC Spektren wurden bei einer Speichertiefe von 2048 Punkten in der direkten Dimension ( $\omega_2$ ) und 256 Zeilen in der indirekten Dimension ( $\omega_1$ ) und einer Messzeit von 20-24 Stunden aufgezeichnet. Zur Verbesserung der Auflösung in der indirekten Dimension wurde der Datenbereich auf 512 Zeilen durch lineare Vorhersage aufgeweitet.

Zur Messungen der  $J^{\text{HN}}$ -Kopplung und der Restdipolkopplungen von *TmCsp* wurde ein <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC Experiment verwendet, dessen <sup>15</sup>N-Entkopplungspuls entfernt worden war.

Eine Referenzierung der Signale auf DSS war nicht notwendig, da hier nur Interesse an den <sup>15</sup>N'-Linienaufspaltungen bestand.

### 6.2.1. Einstellung von Druck- und Temperatur

Saphirzellen standen zum Zeitpunkt der Messungen noch nicht zur Verfügung, sodass 5mm Borosilikatglaskapillaren verwendet wurden. Eine manuell bediente Spindelpresse diente zur Druckeinstellung. Gemessen wurde der Druck mit Hilfe eines Bourdon-Manometers der Genauigkeitsklasse 0,1 ( $\pm 0,6$  MPa).

Die Pausen zwischen den Messungen waren mit mindestens 5 Minuten ausreichend bemessen, um einen Temperatúrausgleich bei Kompression oder Dekompression zu gewährleisten, vor allem aber um den Phospholipiden ausreichend Gelegenheit zur Umorientierung zu geben. Durch aufeinander folgende Messungen der Aufspaltung wurde das Erreichen einer stabilen Phase überprüft.

Zur Einstellung der Temperaturen wurden die Temperiereinheiten des DMX 500 Spektrometers, sowie des DRX 600 Spektrometers verwendet. Da die Schutzhüllen und die Wandstärke der Hochdruckkapillaren den Wärmeübergang zwischen Heizluftstrom und Probe behindern, wurde für die verwendeten Hochdruckkapillaren eine Kalibrierung der Temperatur nach den Angaben von Raiford (1979) durchgeführt. Für den Bereich von 300 K bis 370 K kann mit Gl.6.3. aus dem Abstand  $\Delta\delta$  der Methylen- und Hydroxylsignale von Ethylenglycol die Proben temperatur bestimmt werden. Die Ethylenglycolproben befanden sich in einem identischen Aufbau wie die Lipide bei den Hochdruckmessungen.

$$T(K) = 466,0 - 101,6\Delta\delta \quad (\text{Gl.6.3.})$$

### 6.2.2. Auswertung der Daten

Die spektrale Auswertung, Einstellung der Phase und Basislinienkorrektur erfolgten mit dem Programm XWIN-NMR 2.6 von Bruker, die Benennung der Signale mit dem Programm AUREMOL (Ganslmeier et al. in Vorbereitung). Zur Zuordnung der Signale wurden die Daten der <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC Messungen des vorhergehenden Kapitels über *TmCsp* verwendet.

Die endgültige Datenauswertung und graphische Darstellung erfolgten mit dem Programm EXCEL (Microsoft) und ORIGIN 6.0 (Microcal).

## 6.3. Ergebnisse und Diskussion

### 6.3.1. Druckstabilitätsmessungen an DMPC/DHPC/CTAB

Die Messung der Druckstabilität der Phospholipidmischung erfolgte durch Messung der Quadrupolaufspaltung der Linien des Deuteriumsignals durch partielle Orientierung der  $D_2O$  Moleküle an den Phospholipidbicellen (Salsbury et al. 1972). Abb.6.2. (links) zeigt die Ergebnisse der Messreihen mit 9 Massenprozent Phospholipid. Als Ersatz für das später zu untersuchende *TmCsp* wurde *BPTI* verwendet. Während die nematische Phase bei niedrigen Temperaturen schon bei moderaten Drücken zusammenbricht, erhöht sich der maximale Druck, bei dem noch Orientierung auftritt, mit steigender Temperatur erheblich. Für Temperaturen oberhalb von 331 K kann, wegen der technischen Limitierung des Drucks auf 200 MPa, die nematische Phase nicht mehr zum Verschwinden gebracht werden. Bei noch höheren Temperaturen ist nahezu keine Druckabhängigkeit des Bicellsystems mehr zu beobachten. Höhere Temperaturen konnten wegen Platzens der Kapillare nicht mehr erreicht werden.

Da die in der Literatur genannten Konzentrationen der Phospholipide meist mit 5 Massenprozent angegeben werden (Ottiger & Bax 1998), wurde eine zusätzliche  $p, T$ -Messreihe mit dieser Konzentration durchgeführt. Die Ergebnisse beider Messreihen sind im Anhang Tab.10.26./27. zu finden. Zum besseren Vergleich der beiden Datenreihen wird der Nulldurchgangsdruck eingeführt (Brunner et al. 2001a), bei der sich die Aufspaltung auf Null reduziert. Der Nulldurchgang wird durch Extrapolation der letzten Werte der Druckmessreihen bestimmt, die Resultate werden in Abb.6.2. (rechts) und in Tab.6.1. dargestellt. Die Maximaldrücke beider Lipidkonzentrationen verhalten sich linear, die höher konzentrierte Lösung orientiert jedoch schon bei niedrigeren Temperaturen und ist druckstabiler. Dies ist zu erwarten, da der Grad der Ausrichtung linear von der Konzentration des Lipids abhängt (Brunner et al. 2000). Zur Berechnung des maximalen Druckes sind neben den Messergebnissen die Koeffizienten der Regressionsgeraden zur Berechnung des maximal erreichbaren Druckes bei einer gegebenen Temperatur in Tab.6.1. zu finden.

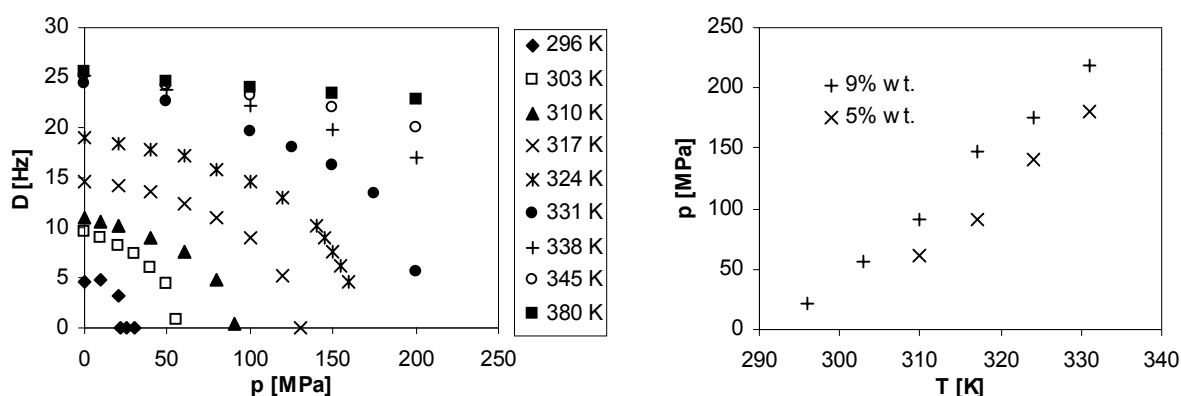


Abb.6.2. Links: Druck- und Temperaturabhängigkeit der Aufspaltung des Deuteriumsignals einer DMPC/DHPC Mischung mit 5 Massenprozent Konzentration. Rechts: Vergleich der maximalen Drücke in Abhängigkeit von der Temperatur und der Lipidkonzentration.

$p_{\max}$ [MPa]	9% wt.	5% wt.
296 K	22	
303 K	56	
310 K	91	60
317 K	147	91
324 K	176	140
331 K	218	181
Koeffizienten der Polynome :		
linear [MPa K <sup>-1</sup> ]	5,7	5,9
konstant [MPa]	-1665	-1767

Tab.6.1. Die Temperaturabhängigkeit des Drucks, bei der die Aufspaltung des Deuterium-signals verschwindet, ist linear und hängt von der Konzentration des Lipids ab.

### 6.3.2. Restdipolkopplungen von *TmCsp*

Die Bestimmung der Restdipolkopplungen mit den reduzierten Probenvolumen in den Hochdruckzellen ist mit Messzeiten von mehr als 20 Stunden pro Druckstufe langwierig und stark fehlerbehaftet. Die geringe Intensität der Signale führt bei der Aufnahme von <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Experimenten dazu, dass in der für die Messung der Restdipolkopplungen wichtigen indirekten Dimension der <sup>15</sup>N<sup>c</sup>-Resonanzen die Signale in den letzten Messungen im Rauschen verschwinden. Daher fehlt die notwendige Auflösung, die auch durch lineare Vorhersage nur in engen Grenzen verbessert werden kann. Weitere Unzulänglichkeiten ergeben sich aus der schlechten Bestimmbarkeit der chemischen Verschiebungen der Signale durch Linienverbreiterung. Durch das orientierende Medium sind die Proteine in ihrer freien Beweglichkeit gehindert, was die rotatorische Korrelationszeit verlängert und zu breiteren Signalen führt. Der Interferenzeffekt aus Dipol-Dipol-Relaxation und Dipol-CSA-Relaxation führt dazu, dass das Signal des <sup>15</sup>N-Dubletts bei niedrigerer <sup>15</sup>N-chemischer Verschiebung gegenüber dem beim höheren ppm Wert verbreitert ist (Werbelow et al. 1977, Fischer et al. 1998).

Zur Beurteilung der Qualität der Messungen ist in Abb.6.3. der Ausschnitt eines <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Experiments von *TmCsp* bei 333 K und 150 MPa in isotroper Lösung (rechts) und im orientierenden Medium (links) dargestellt.

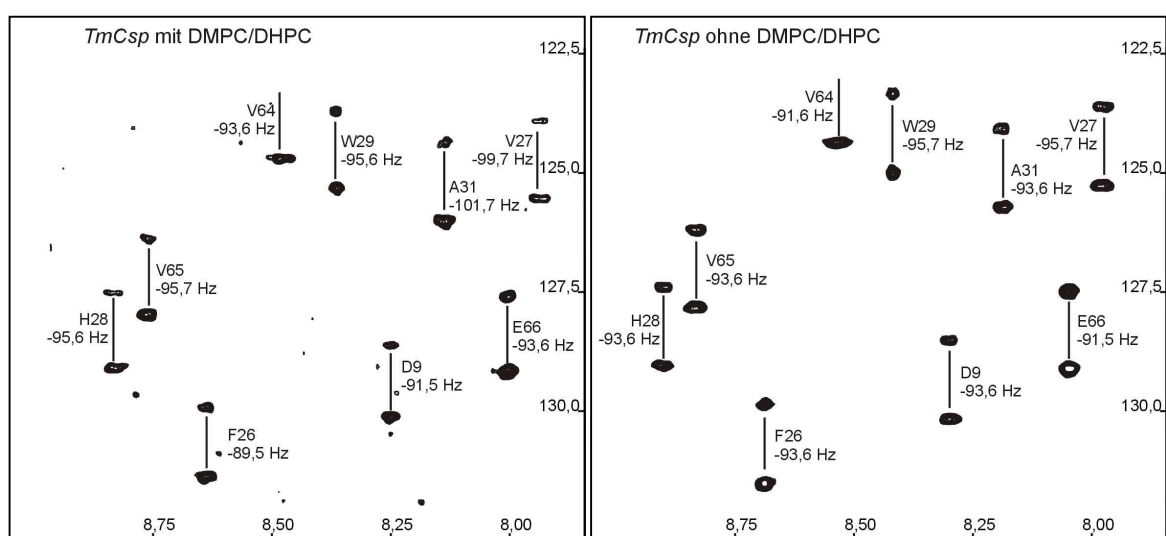


Abb.6.3. Aufspaltung in Hz der <sup>15</sup>N<sup>c</sup>-Signale eines nicht entkoppelten HSQC-Spektrums, in isotroper Lösung (rechts) und im orientierenden Medium (links). Der Differenz der Aufspaltungen in beiden Spektren sind die Restdipolkopplungen.

Die quantitative Abschätzung der Fehler der Linienaufspaltung ist mit Hilfe einer Druckmessreihe, die bei 333 K mit orientierendem Medium (5 Massenprozent) durchgeführt wurde, möglich. Die Temperatur von 333 K wurde gewählt, da hier Messdaten von *TmCsp* bei Normaldruck (Bamann 2001) vorlagen, die als Grundlage der weiter unten folgenden Strukturberechnung dienen. Bei 333 K wandelt sich die nematische Phase des Lipids bei einem Druck von 190 MPa in die isotrope Phase um, Messungen waren damit von Normaldruck bis 150 MPa möglich. Für die Auswertung stehen drei Spektren bei 50 MPa, 100 MPa und 150 MPa zur Verfügung. Zusätzlich steht noch ein Spektrum bei 150 MPa aus einem anderen Ansatz zur Verfügung. Aus nicht bekannten Gründen war es nicht möglich einen einmal in die Borosilikatglaskapillare gefüllten Probenansatz nach einer Lagerung von ca. zwei Wochen wieder in die nematische Phase überzuführen. Dies gelang auch nicht durch mehrfaches Abkühlen und moderates Erwärmen. Vermutlich ist der Probenraum in den Borosilikatglaskapillaren zu gering um eine hinreichende Durchmischung zu erreichen. Absaugen der Probe in der Vakuumanlage und erneutes Befüllen war wegen der starken Schaumbildung des Probenmaterials nicht möglich. Ein direkter Vergleich der Messergebnisse verschiedener Ansätze ist, wegen der linear von der Konzentration des Lipids abhängigen Aufspaltung nicht möglich (Brunner et al. 2000b).

Zur Abschätzung des Fehlers wurden die drei Messpunkte der Signale bei 50, 100 und 150 MPa einer linearen Näherung unterworfen. Die den Spektren entnommenen chemischen Verschiebungen sind im Anhang separat für jedes der beiden Signale der  $^{15}\text{N}$ -Dubletts tabelliert (Tab.10.29.). Für beide Signale der Dubletts wurden die konstanten Koeffizienten  $J_{0a}$  und  $J_{0b}$ , sowie die linearen Koeffizienten  $J_{1a}$  und  $J_{1b}$  der linearen Näherungen der chemischen Verschiebungen berechnet, als Einheit wurde Hz statt ppm gewählt. Die Koeffizienten, sowie die prozentuale Abweichung der Steigungen  $J_{1a}$  und  $J_{1b}$  sind Tab.6.2. zu entnehmen. In Zeilen ohne Angabe sind entweder keine Messwerte oder nur ein Messwert vorhanden, der alleine keine Gerade festlegen kann. Sind nur zwei Messwerte vorhanden, kann kein Messfehler angegeben werden, in diesen Fällen gibt nur der Vergleich  $\Delta J_1$  der Steigungen beider Geraden Auskunft über die Vertrauenswürdigkeit des Ergebnisses (Gl.6.4.)

$$\Delta J_1 = \left| \frac{J_{1a} - J_{1b}}{J_{1a} + J_{1b}} \right| \quad (\text{Gl.6.4})$$

Die hier interessierenden Restdipolkopplungen addieren sich zu den  $J$ -Kopplungen, man erhält Betrag und Vorzeichen aus der Subtraktion der Signalabstände in isotroper Lösung von den im orientierenden Medium gemessenen Abständen (Tjandra & Bax 1997). Die Signalabstände im isotropen Medium wurden im vorangegangenen Kapitel im Abschnitt über die  $J^{\text{HN}}$ -Kopplung vorgestellt, da dort nur zu einem geringen Teil Nichtlinearitäten auftraten, ist es legitim hier zur Berechnung der Linienabstände lineare Näherungen zu verwenden. Diese Ergebnisse werden in Spalte I von Tab.6.2. vorgestellt. Die Resultate der Einzelmessung bei 150 MPa und 333 K sind in Spalte II zu finden. Abb.6.4. zeigt die Daten in graphischer Darstellung. Abgesehen von einigen Ausnahmen verhalten sich die Resultate der Einzelmessung und der genäherten Messreihen ähnlich. Gleichheit ist nicht zu erwarten, da die Orientierung des Proteins und die Aufspaltung der Linien von der Konzentration des Lipids abhängt.

Die Messfehler korrelieren zu 0,33 mit den Austauschraten  $R_K$  (Tab.10.20.) nach Kremer et al. (2001), was durch die geringere Signalqualität stark austauschender Aminosäuren leicht zu erklären ist.



Amino- säure	$\Delta J_I$	$J_{Ia}$ [Hz GPa <sup>-1</sup> ]	$J_{0a}$ [Hz]	$J_{Ib}$ [Hz GPa <sup>-1</sup> ]	$J_{0b}$ [Hz]	I [Hz]	II [Hz]
G3							-0,69
K4	0%	-386,1	-7333,5 ± 2,5	-386,7	-7241,9 ± 2,5	1,85	1,80
V5	3%	-325,3	-7604,1 ± 0,0	-346,0	-7509,1 ± 0,8	2,53	2,87
W7	49%	121,6	-6865,5	41,4	-6765,9	4,32	-3,76
F8	50%	-61,4	-7436,5 ± 0,8	-20,7	-7349,0 ± 0,8	-2,12	1,95
D9	44%	-183,0	-7888,9 ± 2,5	-467,6	-7765,5 ± 9,2	13,76	2,96
S10	9%	-101,6	-7228,4 ± 0,8	-121,6	-7132,1 ± 0,0		
K11	13%	-183,0	-6565,8 ± 0,9	-142,3	-6479,0 ± 2,5		
G15	100%	0,0	-6451,9 ± 1,7	20,1	-6360,9 ± 2,5	0,99	-0,69
F16	0%	-122,2	-7071,0 ± 0,0	-122,3	-6982,8 ± 1,7	5,39	6,12
I17	100%	0,0	-7532,8	407,4	-7471,8	-28,86	5,74
T18	46%	-121,6	-7650,9	-325,9	-7553,1	26,72	0,21
K19	55%	-284,6	-7935,7	-975,4	-7775,0	37,41	2,93
D20	7%	-305,3	-7723,4 ± 0,8	-264,5	-7631,2 ± 10,8	-3,72	-7,11
D24	294%	163,0	-7421,0	-80,2	-7303,0	12,57	28,86
V25	20%	-40,7	-7359,9 ± 0,0	-61,4	-7272,4 ± 2,5	7,51	4,47
F26	4%	-244,5	-7954,6 ± 1,7	-264,5	-7866,5 ± 2,5	9,35	4,97
V27	0%	-40,7	-7632,6 ± 0,0	-40,7	-7534,2 ± 1,7	-4,75	-6,13
H28	8%	-122,2	-7834,6 ± 1,7	-142,3	-7738,4 ± 2,5	0,86	-1,48
W29							-2,49
S30	50%	-122,8	-7172,6	-41,4	-7087,2	-3,50	
A31	55%	-142,3	-7644,1 ± 0,8	-40,8	-7555,2 ± 0,0	-10,45	-8,03
I32	8%	-122,2	-7266,3 ± 0,0	-142,9	-7169,3 ± 0,8	-1,05	-0,72
E33	0%	40,8	-8086,9 ± 1,7	40,8	-7993,3 ± 1,7	-0,31	-4,38
T39	4%	-467,6	-6972,3	-508,4	-6872,6	0,00	6,15
L40	33%	-40,7	-7383,6 ± 1,7	-81,5	-7285,3 ± 1,7	0,53	3,24
K41	0%	81,5	-7300,2 ± 1,6	80,9	-7203,2 ± 0,0	-2,96	0,39
E42							-0,04
G43	8%	-325,9	-6906,8 ± 1,6	-386,1	-6812,0 ± 0,8	7,30	3,62
Q44	16%	-102,2	-7306,3 ± 0,8	-142,3	-7207,4 ± 2,5	1,70	1,03
V45	20%	-163,0	-7681,3	-244,5	-7587,7	10,50	4,36
F48	0%	-122,2	-7227,7 ± 0,0	-122,2	-7133,4 ± 1,7	-0,06	-1,38
E49							-2,33
I50	43%	-81,5	-7425,0	-203,1	-7323,3	9,76	1,61
Q51	0%	-163,0	-7756,6 ± 0,0	-163,0	-7663,0 ± 0,0	0,75	-3,32
G53	133%	40,7	-6915,1 ± 8,3	-285,2	-6774,0 ± 0,0	5,72	
Q58	306%	40,8	-7356,5 ± 3,4	-20,7	-7252,0 ± 2,5	-1,85	-4,23
A59	50%	-101,5	-7575,6 ± 2,5	-305,3	-7460,3 ± 5,8	10,19	-0,67
A60	8%	-142,3	-7555,9 ± 0,8	-121,6	-7465,7	0,29	1,95
H61	23%	-325,9	-7209,3	-204,3	-7125,9	-8,23	-2,15
V62	60%	-20,1	-7244,7 ± 0,8	-81,5	-7144,9 ± 1,6	2,45	1,44
K63	4%	-284,6	-7756,7 ± 0,0	-264,5	-7666,4 ± 0,8	0,58	2,31
V64	18%	-223,8	-7554,6 ± 0,8	-325,3	-7453,5 ± 5,0	6,68	-1,11
V65	34%	-40,7	-7779,0 ± 0,0	-20,1	-7682,1 ± 0,8	-6,58	-2,18
E66	0%	-121,6	-7840,8 ± 1,6	-122,2	-7745,1 ± 1,7	-3,23	-1,23

Tab.6.2. Die Näherungen der chemischen Verschiebungen umgerechnet auf Hz für die beiden Signale der <sup>15</sup>N<sup>c</sup>-Dubletts, mit Angabe der Fehler und prozentualen Unterschied in der Steigung. In Spalte I und II sind die Restdipolkopplungen bei 150 MPa, 333 K tabelliert.

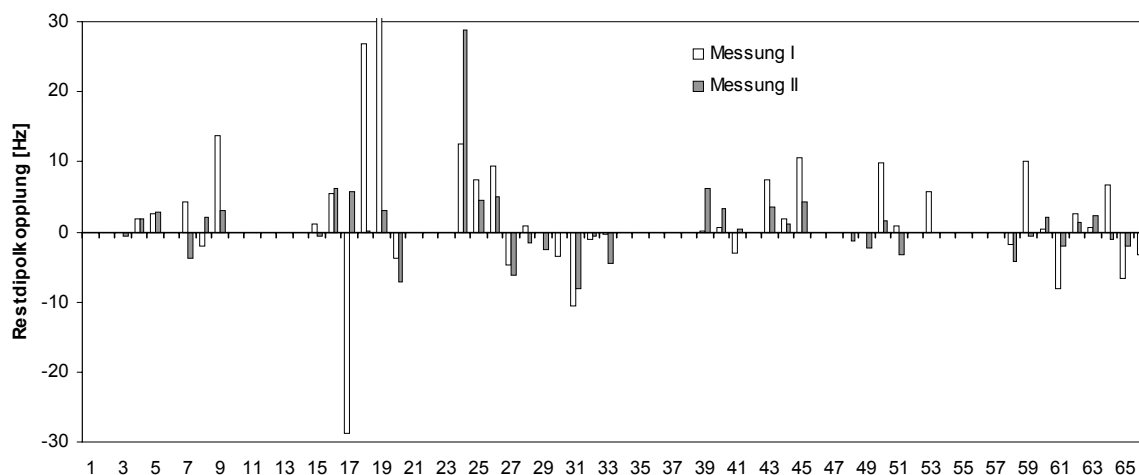


Abb.6.4. Die Restdipolkopplungen der beiden Messungen bei 150 MPa und 333 K verhalten sich abgesehen von einigen Ausnahmen ähnlich. Gleichheit ist nicht zu erwarten, da der Orientierungsgrad des Proteins von der Konzentration des Lipids abhängt.

### 6.3.3. Hochdruckstrukturberechnungen von *TmCsp*

Da für Strukturberechnungen mit Restdipolkopplungen nur in sich starre Strukturen von Proteinen berechnet werden können, müssen die Restdipolkopplungen in den sehr beweglichen Schleifen vor der Berechnung entfernt werden. Aus den verbliebenen Daten wurden nur Daten mit Abweichungen < 50 % aus Tab.6.2. verwendet. Die Ermittlung der Hauptwerte des Orientierungstensors kann aus der grafischen Darstellung wie in Abb.6.5. geschehen (Clare et al. 1998). Für die Benutzung der Daten im Molekulardynamik-Programm CNS (Brünger et al. 1998) ist die Angabe der axialen Komponente  $D_a$  und der Rhombizität  $R$  des Orientierungstensors notwendig, diese sind nach Clare et al. (1998) mit den Komponenten  $D_{xx}$ ,  $D_{yy}$  und  $D_{zz}$  durch das Gleichungssystem Gl.6.5. verknüpft.

$$\begin{aligned} D_{zz} &= 2D_a \\ D_{yy} &= -D_a(1 + 1,5 R) \\ D_{xx} &= -D_a(1 - 1,5 R) \end{aligned} \quad (\text{Gl.6.5.})$$

Das Aufsuchen von axialer Komponente und Rhombizität kann durch geeignete Software erfolgen. Hier wurde MODULE (Dosset et al. 2001) verwendet. MODULE versucht die gemessenen Werte der Restdipolkopplungen mit den berechneten Werten der Restdipolkopplungen aus einer gegebenen Struktur, durch die Wahl des Orientierungstensors, die bestmögliche Übereinstimmung beider Werte zu erreichen.

Als Ausgangsstrukturen wurden die Strukturen von Bamann (2001) und Kremer et al. (2001) verwendet. Dabei ergaben sich Q-Werte, die nach (Ottiger & Bax 1999) den Grad der Abweichung von gemessenen und berechneten Werten angeben. Q-Werte unter 0,3 werden als gute Übereinstimmung von theoretischen zu gemessenen Werten angesehen. Hier wurden Werte um 0,7 erreicht, dies bedeutet die Strukturen stimmen nicht mehr mit den gemessenen Werten der Restdipolkopplungen überein. Für die Kombination der Messreihe II (Tab.6.2) mit der Struktur von *TmCsp* (Kremer et al. 2001) bei 303 K wurden, die in Abb. 6.6. gezeigten Werte, mit MODULE ((Dosset et al. 2001) ermittelt.

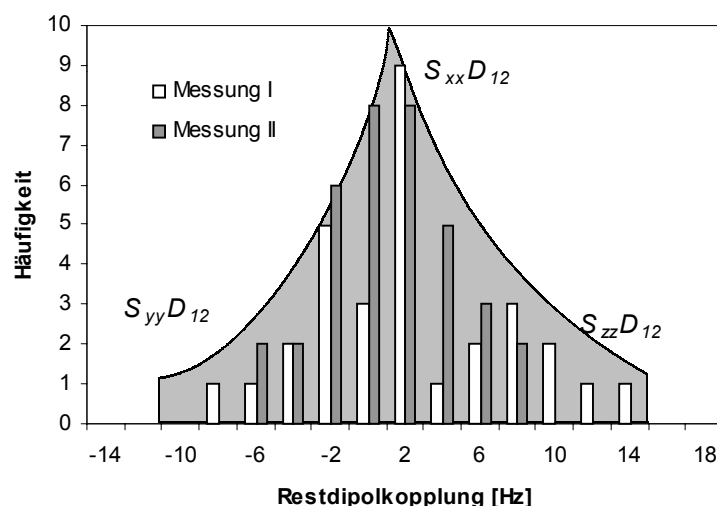


Abb.6.5. Die Häufigkeitsverteilungen der Restdipolkopplungen aus den Messungen I und II. Aus den Eckpunkten der Häufigkeitsverteilungen können die Hauptwerte des Orientierungstensors (Gl.6.2.) bestimmt werden, die zur Berechnung der Struktur benötigt werden (Clare et al. 1998).

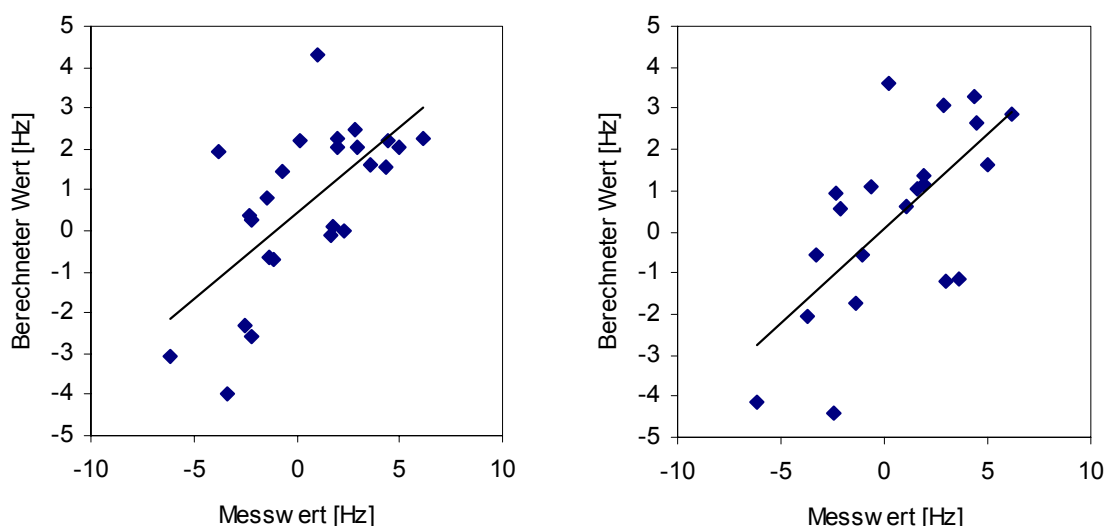


Abb.6.5. Vergleich der gemessenen Werte der Restdipolkopplungen (Messreihe II, Tab 6.2.) mit den von MODULE (Dosset et al 2001) berechneten Werten auf Basis der *TmCsp* Struktur von Kremer et al. (2001) (links) und der durch CNS (Brünger et al. 1998) berechneten Hochdruckstruktur (rechts) bei 150 MPa und 333 K. Wie zu erkennen ist, stimmen die Strukturen wenig mit den gemessenen Restdipolkopplungen überein.

Zur Berechnung der Strukturen wurden als weitere Parameter NOE-Kontakte bei Normaldruck und 303 K von Kremer et al. (2001) und von Bamann bei Normaldruck und 333 K (2001) verwendet. Zusätzlich wurden die in dieser Arbeit gemessenen chemischen Verschiebungen von  $^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}$ -Signalen mit dem Programm TALOS (Cornilescu et al. 1999) in Winkelbeschränkungen umgerechnet und in CNS eingegeben.

Mit den verschiedenen Kombinationen der Messdaten wurden die Molekulardynamikrechnungen (simulated annealing) mit CNS gestartet und jeweils 100 Strukturen ermittelt.

Für die Daten von Bamann (2001) war es nicht möglich mit diesen Kombinationen auch nur annähernd eine Konvergenz der berechneten Strukturen zu erreichen. Die Ergebnisse auf Basis der Daten von Kremer et al. (2001) waren besser. Nach dem ersten Durchgang der Rechnungen wurden die am meisten verletzten NOE Kontakte entfernt und eine erneute Rechnung gestartet. Die Ergebnisse der Strukturen mit den niedrigsten NOE-Pseudoenergien sind in Abb.6.6. zu sehen, eine Konvergenz der Strukturen ist nur für die  $\beta$ -Stränge zu erkennen. Wie in Abb.6.5. (rechts) dargestellt, ist auch für die mittlere Struktur kaum eine Übereinstimmung mit den gemessenen Restdipolkopplungen zu erreichen. Dennoch können aus den errechneten Strukturen einige Erkenntnisse gezogen werden.

Besonders augenscheinlich ist das „Aufschmelzen“ der  $\beta$ -Stränge 1, 2 und 3 gegenüber der Struktur bei 303 K und Normaldruck. Wie in Abb.5.19. der Temperaturabhängigkeiten gezeigt wurde, sind an den Übergängen zwischen den Aminosäuren K6 und W7 sowie F16 und I17 größere Temperaturabhängigkeiten vorhanden. An genau diesen Stellen brechen die Faltblätter 1 und 2 in der Struktur in Abb.6.6. links. Auch die auffallende  $p,T$ -Abhängigkeit von W7, das in Abb.5.32. und Abb.5.35. gezeigt wurde, ist in dieser Region zu finden. Wie bei den Temperaturabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen zu sehen (Abb.5.19.), sind die  $\beta$ -Stränge durch besonders hohe Stabilität gekennzeichnet, die sich auch in der Struktur Abb.6.6. widerspiegelt.

Damit wurde gezeigt, dass prinzipiell Strukturinformationen unter Hochdruck mit Restdipolkopplungen zu ermitteln sind. Durch die Verwendung der neuen Saphirzellen sollten hier in Zukunft noch wesentliche Verbesserungen möglich sein.

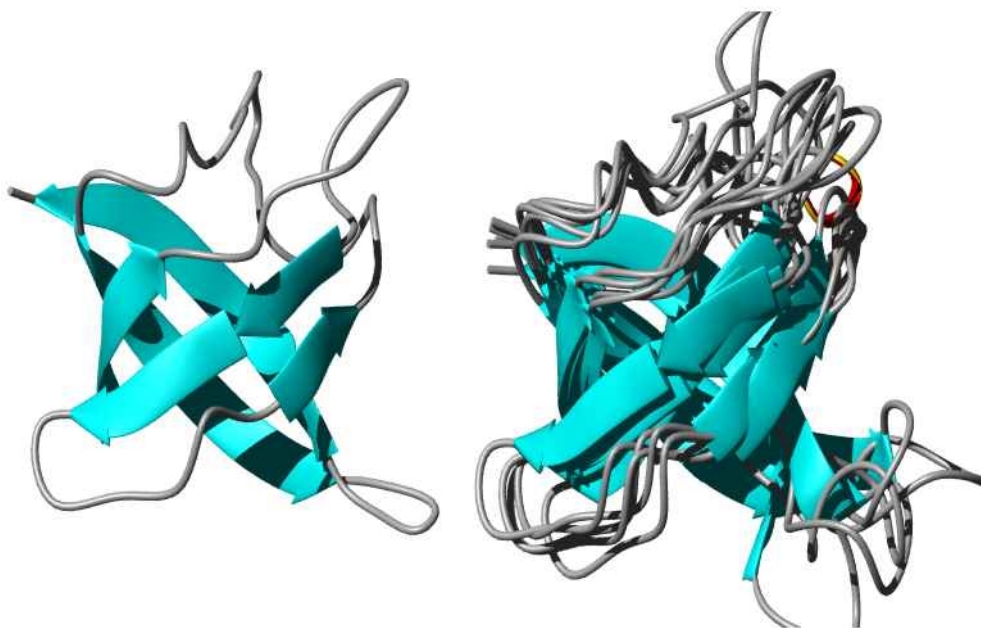


Abb.6.6. Die mit CNS berechneten Hochdruckstrukturen konvergieren im Bereich der  $\beta$ -Stränge, die Schleifen sind äußerst flexibel. Die mittlere Struktur (links) zeigt in Übereinstimmung mit den Beobachtungen der chemischen Verschiebungen aus Kapitel 5 ein Aufschmelzen der  $\beta$ -Stränge 1, 2, 3.

## 7. Literatur

Abragam A., Goldman M., Nuclear Magnetism: order and disorder, *Oxford University Press, New York*, (1982)

Akasaka K., Kwakami M., Microwave Temperature-Jump NMR, Dynamics Structure and Function of Biological Macromolecules, O. Jardetzky and M.D. Finucane (Eds.) *IOS Press*, (2001).

Akasaka K., Li H., Dubovskii P., H.-R. Kalbitzer, Yamada H., High Resolution-High Pressure NMR Spectroscopy, Dynamics, Structure and Function of Biological Macromolecules O.Jaredetzky and M.D. Finucane (Eds.) *IOS Press*, (2001)

Akasaka K., Li H., Low-Lying Excited States of Proteins Revealed from Nonlinear Pressure Shifts in  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR, *Biochemistry*, 40(30), (2001), 8665-8671

Akasaka K., Li H., Yamada H., Li R., Thoresen T., Woodward C.K., Pressure response of protein backbone structure. Pressure-induced amide  $^{15}\text{N}$  chemical shifts in BPTI. *Prot.Sci.* 8, (1999a), 1946-1953.

Akasaka K., Tezuka T., Yamada H., Pressure-induced changes in the folded structure of lysozyme. *J. Mol. Biol.* 271, (1997), 671-678.

Akasaka K., Yamada H., On-Line Cell High-Pressure Nuclear Magnetic Resonance Technique: Application to Protein Studies. *Methods in Enzymology* 338, . (2001), 134-158

Angell C.A., Bressel A., Hemmati R., Share M., Tucker C., Water and its anomalies in perspective: tetrahedral liquids with and without liquid-liquid phase transitions, *Phys.Chem.Chem.Phys.* 2, (2000), 1559

Angell C.A., in Water a comprehensive treatise, *F. Franks ed., Plenum Press, New York*, (1982), 7, 1

Arnold M.R., Kremer W., Lüdemann H.-D., Kalbitzer H.R.,  $^1\text{H}$ -NMR Parameters of Common Amino Acid Residues Measured in Aqueous Solutions of the Linear Tetrapeptides Gly-Gly-X-Ala at Pressures between 0.1 and 200 MPa. *J.Phys.Biochem*, (2001), im Druck.

Arnold M.R., Lüdemann H.-D., The pressure dependence of self diffusion and spin lattice relaxation in cold and supercooled  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{D}_2\text{O}$ , *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4 (2002), 1581-1586

Auerbach G., Ostendorp R., Prade L., Korndorfer I., Dams T., Huber R., Jaenicke R., Lactate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga Maritima* - the crystal structure at 2.1Å resolution reveals strategies for intrinsic protein stabilization. *Structure* 6, (1998) 769-781

Bachl F., NMR-Spektroskopische Untersuchungen zur Dynamik einfacher Kohlenwasserstoffe bis 600MPa, Dissertation, *Universität Regensburg* (1988)

Bai Y., Milne J.S., Mayna L., Englander S., Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen Exchange, *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* 17, (1993), 75-86

Balbach J., Schmid F.X., Proline isomerization and its catalysis in protein folding, *Mechanisms of Protein Folding*, Pain R.H., Oxford University Press, (2000), 212-217

Ballard L., Yu A., Reiner C., Jonas J., A High Pressure, High-Resolution NMR Probe for Experiments at 500 MHz, *J.Mag.Res* 133, (1998), 190-193

- Bamann C., Hochtemperaturstruktur des Kälteschockproteins aus *Thermotoga maritima*, Diplomarbeit an der Universität Regensburg (2001)
- Bax A., Davis D.G., MLEV-17-Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy, *J.Magn.Reson.* 65, (1985), 355-360
- Bax A., Tjandra N., High Resolution heteronuclear NMR of human ubiquitin in an aqueous liquid crystalline medium, *J.Biomol.NMR*, 10, (1997), 289-292
- Baxter N.J., Hosszu L.L.P., Waltho J.P., Williamson M.P., Characterisation of low free-energy excited states of folded proteins, *J.Mol.Biol.* 284, (1998), 1625-1639
- Beger R.D., Bolton P.H., Protein  $\Phi$  and  $\Psi$  dihedral restraints determined from multidimensional hypersurface correlations of backbone chemical shifts and their use in the determination of protein tertiary structures, *J. of Biomol. NMR*, 10 (1997), 129-142
- Bieri O., Kiefhaber T., Kinetic models in protein folding, in : Mechanisms of Protein Folding, Pain R.H., Oxford University press (2000), 34-63
- BioMagResBank (BMRB), University of Wisconsin-Madison, <http://www.bmrb.wisc>.
- Bloch F., Nuclear Induction , *Phys. Rev.* 70, (1946), 460
- Bluyssen H., Verhoeven J., Dymanus A., Hyperfine structure of HDO and deuterium oxide by beam maser spectroscopy, *Phys. Lett.*, 25A, (1967), 214
- Bodenhausen G., Ruben D.J., Natural abundance nitrogen-15-NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy, *Chem.Phys.Lett.*, 69, (1980), 185-188
- Bothner-By A.A., Magnetic field induced alignment of molecules . In: Grant D.M., Harris R.K., editors. Encyclopedia of nuclear magnetic resonance. Wiley, London (1996), 2932-2938
- Braunschweiler L., Ernst R.R., Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 53, (1983), 521-528
- Bridgman P.W., Change of phase under pressure II. New melting curves with a general thermodynamic discussion of melting, *Phys. Rev.* 6 (1915), 94-112
- Bridgman P.W., The coagulation of albumen by pressure, *J. Biol. Chem* 19 (1914), 511-512
- Brosnan S.G.P., Edmonds D.T., Proton fine structure in the nuclear quadrupole double resonance spectrum of oxygen-17 naturally abundant in ice at 77 K *J. Mol. Struct.*, 58, (1980), 23
- Brünger A.T., Adams P.D., Clore G.M., De Lano W.L., Gros P., Grosse-Kunstleve R.W., Jiang J.-S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N.S., Read R.J., Rice L.M., Simonson T., Warren G.L., Crystallography & NMR System: A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Cryst. D*54, (1998), 905-921
- Brunner E., Arnold M.R., Kremer W. und Kalbitzer H.R., Pressure-stability of phospholipid bicelles: Measurement of residual dipolar couplings under extreme conditions, *J.Biomolecular NMR*, 21, (2001a), 173-176.
- Brunner E., Residual Dipolar Couplings in Protein NMR, *Concepts in Magnetic Resonance*, Vol. 13(4), (2001b), 238-259
- Brunner E., Ogle J., Wenzler M., Kalbitzer H.R., Molecular alignment in proteins: Quantitative evaluation of effects induced in 2D COSY spectra of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, (2000), 694-698

- Bundi A., Wüthrich K.,  $^1\text{H}$ -NMR Parameters of the Common Amino Acid Residues Measured in Aqueous Solutions of the Linear Tetrapeptides H-Gly-Gly-X-Ala. *Biopolymers*, Vol. 18 (1979b), 285-297.
- Bundi A., Wüthrich K., Use of Amide  $^1\text{H}$ -NMR Titration Shifts for Studies of Polypeptide Conformation. *Biopolymers*, Vol. 18, (1979a), 299-311.
- Cavagnero S., Dyson H.J., Wright P.E. Improved low pH bicelle system for orienting macromolecules over a wide temperature range. *J.Biomol.NMR*, 13, (1999), 387-391
- Chou, P. Y. und Fasman, G. D., Prediction of protein conformation, *Biochemistry* 13, (1974), 222-245
- Clegg R.M., Maxfield B.W., Chemical kinetic studies by a new small pressure perturbation method, *Rev.Sci.Inst.* 47(11), (1976), 1383-1393
- Clare G.M., Gronenborn A.M., Bax A., A Robust Method For Determining the Magnitude of the Fully Asymmetric Tensor of Oriented Macromolecules in the Absence of Structural Information, *J.Mag.Res.* 133, (1998), 216-224
- Cornilescu G., Delaglio F. Bax A., Protein backbone restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology, *J. of Biomol. NMR*, 13 (1999), 289-302
- Cummins P.L., Bacskey G.B., Hush N.S., *Mol. Phys.*, 62, (1987), 193
- Dill K.A., Chan H.S., From Levinthal to pathways to funnels, *nature structural biology*, 4, (1997), 10-19
- Dosset P., Hus J.C., Marion D., Blackledge M., A novel interactive tool for rigid-body modeling of multi-domain macromolecules using residual dipolar couplings, *J. of Biomol. NMR*, 20, (2001), 223-331
- Drljaca, C.D. Hubbard, van Eldik R., Asano T., Basilevski M.V., le Noble W.J., Activation and Reaction Volumes in Solutions. *Chem. Rev.* 98, (1998), 2167-2284
- Edmonds D.T., Mackay A.L., The pure quadrupole resonance of the deuteron in ice, *J. Mag. Reson.*, 20, (1975), 515-519
- Errington J.R., Debenedetti P.G., Relationship between structural order and the anomalies of liquid water, *Nature*, 409, (2001), 318
- Ferguson J. et al., Hydrogen ion buffers for biological research, *Anal.Biochem* 104, (1980), 300-310
- Fischer M.W.F., Majumdar A., Zuiderweg E.R.P., Protein NMR relaxation: theory, applications and outlook, *Prog. NMR Spectr.* 33, (1998), 207-272
- Friebolin H., Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, 3.Auflage, *Wiley-VCH*, (1999)
- Fuchigami M., Teramoto A., Texture and Structure of High-Pressure-Frozen Food Gels, in E.Ludwig, *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Springer- Verlag, (1999), 493-496
- Gaemers S., Elsevier C.J., Bax A., NMR of biomolecules in low viscosity , liquid  $\text{CO}_2$ , *Chem.Phys.Lett.* 301, (1999), 138-144
- Gekko K., Hasegawa Y., Effect of temperature on the compressibility of native globular proteins, *J.Phys.Chem.* 93 (1989), 426-429

- Gillen K.T., Douglass D.C., Malmberg M.S., Maryott A.A., NMR relaxation study of liquid fluorotrichloromethane. Reorientational and angular momentum correlation times and rotational diffusion, *J. Chem. Phys.*, 57, (1972), 5117
- Graumann P.L., Marahiel M.A., A superfamily of proteins that contain the cold shock domain. *Trends. Biochem. Sci.*, 23, (1998), 286-290
- Graumann P.L., Wendrich T.M., Schröder M.H.W., Marahiel M.A., A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures, *Mol. Microbiol.*, 25, (1997), 741-756
- Grigoriev I.S., Meilikhov E.Z., CRC Handbook of Physical Quantities, CRC-Press (1997)
- Gross M., Jaenicke R., Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, Vol 221, 2, (1994), 617-630
- Groß Th., Intradiffusion in binären Mischungen mit Kohlendioxid oder Ammoniak, Dissertation 2000 Universität Regensburg.
- Hahn E.L., Nuclear induction due to free Larmor precession, *Phys. Rev.* 80, (1950), 580
- Haigh C.W., Mallion R.B., Ring current theories in nuclear magnetic resonance, *Prog. NMR Spectrosc.* 13, (1979), 303-344
- Harlow A., Thesis, *Imperial College London* (1967).
- Harris K.R., Woolf L.A., Pressure and Temperature Dependence of the Self Diffusion Coefficient of Water and Oxygen-18 Water, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, 76, (1980), 377-385
- Hauer H., Lüdemann H.-D., Jaenicke R., Free Activation Energies and Activation Volumes for the Amide Rotation in Some Peptides Studied by High Pressure  $^1\text{H}$ -High Resolution NMR. *Z. Naturforsch.* 37 c, (1982), 51-56
- Hauer J., Hochauflösungs NMR Spektroskopie unter hohem hydrostatischen Druck an Amidien und monomeren biologischen Molekülen. Dissertation an der Universität Regensburg (1981)
- Hauer J., Völkel G., Lüdemann H.-D., High-pressure High-resolution Nuclear Magnetic Resonance. Part IV  $\Delta V^\ddagger$  and  $\Delta G^\ddagger$  for the Rotation of the Amide Group in Formamide, Acetamide, *N,N*-Diethylbenzamide, *N,N*-Di-isopropylbenzamide and *N*-Isopropyl-*N*-methylacetamide. *J. Chem. Research (S)*, (1980), 16-17
- Heremans K., Smeller L., Protein structure and dynamics at high pressure, *Biochimica et Biophysica Acta* 1386, (1998), 353-370
- Hindman J.C., Svirnickas A., Wood M., The Spin Lattice Relaxation of Oxygen-17 in Water, *J. Phys. Chem.*, 74, (1970), 1266
- Hoffmann R., Hoffmann T., Tholey A., Schulte A.C., Kalbitzer H.R., Synthesis and NMR-Spectroscopy of Peptides Containing either phosphorylated cis- or trans-4-hydroxy-L-proline. *J. Peptide Res.* 49 (1997), 163-173.
- Hoffmann R., Reichert I., Wachs W.O., Zeppezauer M., Kalbitzer H.R.,  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy of Phosphorylated Model Peptides. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 44 (1994), 193-198.
- Hoffmann R., Wachs W.O., Berger R.G., Kalbitzer H.R., Waidelich D., Baier E., Zeppezauer M., Chemical Phosphorylation of the Peptides GGXA (X=S; T; Y): an Evaluation of Different Chemical Approaches. *Int. J. Peptide Protein. Res.* 45 (1995), 26-34.



- Holz M., Weingärtner H., Calibration in Accurate Spin-Echo Self-Diffusion Measurements Using  $^1\text{H}$  and Less Common Nuclei, *J. Magn. Res.* 92, (1991), 115-125
- Hougen J.T., Reinterpretation of molecular beam hyperfine data for  $^{14}\text{NH}_3$  and  $^{15}\text{NH}_3$ , *J. Chem. Phys.*, 57, (1972), 4207-4217
- Hubbard C.D., Caswell D., Lüdemann H.-D., Arnold M.R., Characterisation of Pressure-Treated Skimmed Milk Powder Dispersions: Application of NMR Spectroscopy, *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2001), in press.
- Huber R., Langworthy T.A., König H., Thomm M., Woese C.R., Sleytr U.B., Stetter K.O., *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C, *Arch. Microbiol.* 144, (1986), 324-333
- Hummer G., Garde S., García A.E., Paulaitis M.E., Pratt L.R., The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol., 95, (1998), 1552-1555
- Inoue K., Yamada H., Akasaka K., Herrmann C., Kremer W., Maurer T., Döker R., Kalbitzer H.R., Pressure-induced local unfolding of the Ras binding domain of RalGDS. *Nature Struct. Biol.* 7, (2000), 547-550.
- Inoue K., Yamada H., Imoto T., Akasaka K., High pressure NMR study of a small protein, gumarin. *J. Biomol. NMR* 12, (1998), 535-541.
- Isaacs N.S., Liquid Phase High Pressure Chemistry. John Wiley & Sons (1978), 99
- Iwadate M., Asakura T., Dubovskii P.V., Yamada H., Akasaka K., Williamson M.P., Pressure-dependent changes in structure of the melittin  $\alpha$ -helix determined by NMR, *J. of Biomol. NMR*, 19, (2001), 115-124
- Jackson S.E., How do small single-domain proteins fold? *Folding and Design*, 3, R81, (1998)
- Jacob M., Holtermann G., Perl D., Reinstein J., Schindler T., Geeves M.A., Schmid F.X., Microsecond Folding of the Cold Shock Protein Measured by a Pressure Jump-Technique, *Biochemistry* 38 (1999), 2882-2891
- Jonas J., De Fries T., Wilbur D.J., Molecular motions in compressed liquid water, *J. Chem. Phys.* 65, (1976), 582
- Jonas J., Jonas A., High-pressure NMR-spectroscopy of proteins and membranes. *Ann. Rev. Biophys. Biom.* 23 (1994), 287-318.
- Jonas J., Nuclear magnetic resonance at high pressure. *Science* 216, (1982), 1179-1184
- Kalbitzer H.R., Görler A., Li H., Dubovskii P.V., Hengstenberg W., Kowolik C., Yamada H., Akasaka K.,  $^{15}\text{N}$  and  $^1\text{H}$  NMR study of Histidine containing protein (HPr) from *Staphylococcus carnosus* at high pressure, *Prot. Sci.* 9 (2000), 693-703.
- Kalbitzer H.R., Rösch P., The Effect of Phosphorylation of the Histidyl Residue in the Tetrapeptide Gly-Gly-His-Ala. Changes of Chemical Shift and pK-Values in  $^1\text{H}$ - and  $^{31}\text{P}$ -NMR Spectra. *Org. Magn. Reson.* 17 (1981), 88-91.
- Kalinichenko P., Lobyshev V.P., Should the pH = pD condition be used in biological experiments with heavy water as solvent ?, *Stud. Biophys* 58, (1976), 235-240
- Kamatari Y.O., Yamada H., Akasaka K., Jones J.A., Dobson C.M., Smith L.J., Response of native and denatured hen lysozyme to high pressure studied by  $^{15}\text{N}$  /  $^1\text{H}$  NMR, *Eur. J. Biochem.* 268, (2001), 1-13

- Kanno H., Speedy R. J., Angell C. A., Supercooling water to  $-92\text{ }^{\circ}\text{C}$ , *Science*, 189, (1975), 880-881
- Karshikoff A., Ladenstein R. Proteins from thermophilic and mesophilic organisms essentially do not differ in packing. *Protein Eng.* 11, (1998), 867-872
- Kato C., Yanagibayashi M., Nogi Y., Li L., Horikoshi K., Changes in the Microbial Community in Deep-Sea Sediment During Cultivation Without Decompression, in E. Ludwig, *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology* 21-24, Springer- Verlag, (1999).
- Kell G.S. Thermodynamic and Transport Properties of Fluid Water, in Water a Comprehensive Treatise, Franks F. ed. *Plenum Press*, New York, 1, (1972), 363-412
- Kharakoz D.P., Protein Compressibility, Dynamics and Pressure, *Biophysical Journal*, 79, (2000), 511-525
- Kitahara R., Sareth S., Yamada H., Ohmae E., Gekko K., Akasaka K., High pressure NMR reveals active site hinge motion of folate-bound Escherichia coli Dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 39, (2000), 12789-12795.
- Kitahara R., Yamada H., Akasaka K., Two Folded Conformers of Ubiquitin Revealed by High-Pressure NMR. *Am.Chem.Soc.* (2001),
- Kitamura Y., Itoh T., Reaction Volume of Protonic Ionization for Buffering Agents. Prediction of Pressure Dependence of pH and pOH, *J. Solution Chem.* 16(9), (1987), 715
- Klimke G., Hauer J., Lüdemann H.-D., Pfeleiderer W., The Activation Volume of the *syn*  $\rightleftharpoons$  *anti* Rotation of Lumazine  $\beta$ -Riboside. *J.Chem. Research (S)*, (1981), 80-81
- Kremer W., B. Schuler, S. Harrieder, M. Geyer, W. Gronwald, Ch. Welker, R.Jaenicke, H.R. Kalbitzer, Solution NMR structure of the cold shock protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Eur. J. Biochem.* 268, (2001), 2527-2539
- Kukolich S.G., Measurements of hyperfine structure in ammonia-d1, *J. Chem. Phys.*, 49, (1968), 5523
- Lambert Y., Demazeau G., Largeteau A., J.M. Bouvier, Effects of High Hydrostatic Pressure on the Aromatic Compounds of Strawberry "Coulis", in E. Ludwig, *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology* 439-444, Springer- Verlag, (1999)
- Lang E.W., Girlich D., Lüdemann H.-D., Piculell L., Müller D., Proton Spin-Lattice Relaxation Rate in Supercooled  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  under High Pressure, *J. Chem. Phys.*, 93, (1990), 4796
- Lang E.W., Lüdemann H.-D., Pressure and Temperature Dependence of the Longitudinal Deuterium Relaxation Rates in Supercooled Heavy Water to 300 MPa and 190 K, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 84, (1980), 462
- Lang E.W., Lüdemann H.-D., High Pressure O-17 Longitudinal Relaxation Time Studies in Supercooled  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{D}_2\text{O}$ , *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.*, 85, (1981), 603
- Lang E.W., Lüdemann H.-D., Sauerstoff-17 Spin-Gitter-Relaxationszeiten  $T_1$  im unterkühlten leichten und schweren Wasser und Protonen  $T_1$ -Messungen im leichten, mit O-17 angereicherten Wasser, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.*, 85, (1981), 1016
- Lang E.W., Lüdemann H.-D., Pressure- and Temperature Dependence of the Longitudinal Proton Relaxation Times in Supercooled Water to  $-87^{\circ}\text{C}$  and 2500 bar, *J. Chem. Phys.*, 67, (1977), 718

- Lang E.W., Lüdemann H.-D., Piculell L., Nuclear Magnetic Relaxation Rate Dispersion in Supercooled Heavy Water Under High Pressure, *J. Chem. Phys.*, 81, (1984), 3820
- Lee Y., Jonas J., Density Effects on the dynamic structure of liquid deuterium oxide, *J. Chem. Phys.* 57, (1972), 4233
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M., Principles of Biochemistry Second Edition. *Worth Publishers* (1993)
- Levinthal, C. (1969), How to fold gracefully. *Mössbauer spectroscopy in biological systems*, De Grunner P., Tsigris J.C.M., Münck E. (eds.). Monticello, Illinois, Seite.22
- Levitt M.H., R. Frayman, T. Frenkel, Supercycles for broadband heteronuclear decoupling, *J. Magn. Reson.* 50, (1982), 157-160.
- Li H., Yamada H., Akasaka K., Effect of pressure on the tertiary structure and dynamics of folded basic pancreatic trypsin inhibitor. *Biophys. J.* 77, (1999), 2801-2812.
- Li H., Yamada H., Akasaka K., Effect of pressure on individual hydrogen bonds in proteins. Basic pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* 37, (1998), 1167-1173.
- Lide D., CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81<sup>st</sup> Edition (2000-2001)
- Live D.H., Davis D.G., Agosta W.C., Cowburn D., Long range hydrogen bond mediated effects in peptides: <sup>15</sup>N NMR study of gramicidin S in water and organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 106, (1984), 1939-1941.
- Lopez M.M., Yutani K., Makhatadze G.I., Interactions of the major cold shock protein CspB with single-stranded DNA templates of different base composition. *J. Biol. Chem.* 274, (1999), 33601-33608.
- Losonczi J.A., Prestegard J.H., Improved dilute bicelle solutions for high-resolution NMR of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR*, 12, (1998), 447-451
- Losonczi J.A., Andrec M., Fischer M.W.F., Prestegard J.H., Order Matrix Analysis of Residual Dipolar Couplings Using Singular Value Decomposition, *J. Mag. Res.* 138, (1999), 334-342,
- Lüdemann H.D., Influence of Pressure on Protein Conformation, *Makromol. Chem., Makromol. Symp.* 17, (1988), 29-38
- Ludvigsen S., Andersen K.V., Poulsen F.M., Accurate measurements of coupling constants from two-dimensional nuclear magnetic resonance spectra of proteins and determination of  $\Phi$ -angles, *J. Mol. Biol.* 217, (1991), 731-736
- Ludwig R., Weinhold F., Farrar T.C., Temperature Dependence of the Deuteron and Oxygen Quadrupole Coupling Constants of Water in the System Water/Dimethyl Sulfoxide, *J. Chem. Phys.* 103, (1995), 6941
- Maik J., Holtermann G., Perl D., Reinstein J., Schindler T., Geeves M.A., Schmid F.X., Microsecond Folding of the Cold Shock Protein Measured by a Pressure-Jump Technique, *Biochemistry* 38, (1999), 2882-2891.
- Markley J.L., Bax A., Arata Y., Hilbers C.W., Kaptein R., Sykes B.D., Wright P.E., Wüthrich K., Recommendations for Presentations of NMR Structures of Proteins and Nucleic Acids, *Pure & Appl. Chem*, Vol. 70, No.1, (1998), 117-142
- Markley J.L., Northrop D.B., Royer C.A., eds. High-Pressure Effects in Molecular Biophysics and Enzymology, Oxford University Press (1996).

- Merutka G., Dyson H.J., Wright P.E., Random Coil  $^1\text{H}$  chemical shifts obtained as a function of temperature and trifluoroethanol concentration for the peptide series GGXGG. *J. of Biomol.NMR*, 5, (1995), 14-24
- Meiler J., Blomberg N., Nilges M., Griesinger C., A new approach for applying residual dipolar couplings as restraints in structure elucidation, *J.Biomol.NMR*, 16, (2000), 245-252
- Mishima O., Stanley H.E., The relationship between liquid supercooled and glassy water, *Nature*, 396, (1998), 329
- Mishima O., Stanley H.E., Decompression-induced melting of ice IV and the liquid-liquid transition in water, *Nature* 392, (1998), 164
- Mueller U., Perl D., Schmid F.X., Heinemann U., Thermal Stability and Atomic-Resolution Crystal Structure of the Bacillus Caldolyticus Cold Shock Protein. *J.Mol.Biol.*, 297, (2000), 975-988
- Neidig K. P., Geyer M., Görler A., Antz A., Saffrich R., Beneicke W., Kalbitzer H.R., AURELIA, a program for computer-aided analysis of multidimensional NMR-Spectra. *J. of Biomol. NMR*, 6, (1995), 255-270
- Némethy, G. und Printz M.P., The  $\gamma$ -turn, a possible folded conformation of the polypeptide chain. Comparison with the  $\beta$ -turn, *Macromolecules* 5, (1972), 755-758
- Neuman R.C.Jr., Kauzmann W., Zipp A., Pressure Dependence of Weak Acid Ionisation in Aqueous Buffers. *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 77, No. 22 (1973), 2687-2691.
- Nölting B. Protein Folding Kinetics, biophysical methods, *Springer* (1999)
- O'Reilly D.E., Eraker J.H., Deuteron magnetic resonance of the solid phases of deuterium sulfide, *J. Chem. Phys.*, 52(5), (1970), 2407
- Ösapay K., Case D.A., A New Analysis of Proton Chemical Shifts in Proteins, *J.Am.Chem.Soc.* 113, (1991), 9436-9444
- Osipov Y.E., Zheleznyi B.V., Bondarenko N.F., *Russ. J. Phys. Chem.* 51, (1977), 1264
- Ottiger M., Bax A., Bicelle-based liquid crystals for NMR-measurement of dipolar couplings at acidic and basic pH values. *J.Biomol NMR* 13, (1999), 187-191
- Ottiger M., Bax A., Characterization of magnetically oriented phospholipid micelles for measurement of dipolar couplings in macromolecules. *J.Biomol NMR* 12, (1998), 361-372
- Palmer A.G., Cavanagh J., Wright P.E., Rance M., Sensitivity Improvement in Proton-Detected Two-Dimensional Heteronuclear Correlation NMR Spectroscopy, *J.Magn.Reson.* 93, (1991), 151-170
- Pervushin K., Riek R., Wider G., Wüthrich K., Attenuated  $T_2$  relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 94, (1997), 12366-12371
- Peshkovsky A., Mc Dermott A.E. Dipolar interactions in molecules aligned by strong AC electric fields. *J.Magn.Reson.* 147, (2000), 104-109.
- Piotto M., Saudek V., Skleanar V., Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions, *J.Biomol. NMR* 2(6), (1992), 661-665
- Platz G., Hoffmann H., Pressure shock apparatus for studying fast reactions in solutions. Measurements on magnesium complexes. *Ber. Bunsenges.* 76(10), (1972), 491-495

- Pottel R., Asselborn E., Eck R. Tresp V., Dielectric relaxation rate and static dielectric permittivity of water and aqueous solutions at high pressures. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 93(6), (1989) 676-681
- Price W.E., Lüdemann H.-D., NMR and Diaphragm Cell Techniques for the Study of Molecular Dynamics in Fluids. In: High Pressure Techniques in Chemistry and Physics : A Practical Approach. Holzapfel W.B., Isaacs N.S, eds. *Oxford University Press, Oxford Chapter 5* (1997), 225
- Prielmeier F.X., Lang E.W., Speedy R.J., Lüdemann H.-D., The Pressure Dependence of Self Diffusion in Supercooled Light and Heavy Water, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.*, 92, (1988), 1111
- Prielmeier F.X., Lang E.W., Speedy R.J., Lüdemann H.-D., Diffusion in Supercooled Water to 300 MPa, *Phys. Rev. Lett.* 59, (1987), 1128
- Privalov P.L., Makhatadze G.I., Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. II. The entropy and Gibbs energy of hydration. *J.Mol.Biol.* 232(2), (1993), 660-679
- QSIL Katalog Quarzschmelze Ilmenau GmbH, Laborgeräte und Sondererzeugnisse aus Quarzglas (1997), Seite 5.
- Rabideau S.W., Waldstein P., Oxygen-17 NMR in polycrystalline H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O ice, *J. Chem. Phys.*, 45, (1966), 4600
- Raiford D. S., Fisk C. L. Becker E. D., Calibration of methanol and ethylene glycol nuclear magnetic resonance thermometers, *Anal.Chem* 51, (1979), 2050-2051
- Rehm H., Proteinbiochemie / Proteomics, 3.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin 2000
- Riley S.A., Augustine M.P., Extracting residual NMR dipolar coupling constants from electrical aligned liquids. *J.Phys.Chem. A*, 104, (2000), 3326-3331
- Salsbury N.J., Darke A., Chapman D., Deuteron magnetic resonance studies of water associated with phospholipids, *Chem. Phys. Lipids*, 8, (1972), 142-151
- Sanders II C.R., Landis G.C., Reconstitution of membrane proteins into lipid-rich bilayered mixed micelles for NMR studies. *Biochemistry* 34, (1995), 4030-4040.
- Saupe A., Hochaufgelöste Protonenresonanzspektren mit direkter magnetischer Dipol-Dipol-Wechselwirkung, Teil II, *Z.Naturforsch.* 19a, (1964), 172-177
- Saupe A., Kernresonanzen in kristallinen Flüssigkeiten und in kristallinflüssigen Lösungen Teil I, *Z.Naturforsch.* 19a, (1964), 161-171
- Schindler T., Schmid F.X., Thermodynamics of an Extremely Rapid Protein Folding Reaction, *Biochemistry* 35, (1996), 16833-16842
- Schlemmer H., Sontheimer G.M., Kalbitzer H.R., <sup>31</sup>P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of the Phosphorylated Tetrapeptide Gly-Gly-Asp-Ala. *Magn. Reson. Chem.* 26, (1988), 260-263.
- Schott-Rohrglas GmbH, DURAN Glas Katalog 2000, Röhren, Kapillaren und Stäbe aus Borosilicat-glas 3.3, Seite 12-13.
- Schultz C.P., Illuminating folding intermediates, *Nat. Struct. Biol.*, 7, (2000), 7-10

- Schwarzinger S., Kroon G.J.A., Foss T.R., Wright P.E., Dyson H.J., Random coil chemical shifts in acidic 8 M urea: Implementation of random coil shift data in NMRView. *J. Biomol. NMR*, 18 (2000), 43-48.
- Silva J.L., Foguel D., Royer C.A., Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure, *TRENDS in Biochemical Sciences*, 26, 10, (2001), 612-618
- Sklenar V., Piotto M., Leppik R., Saudek V., Gradient Tailored Water Suppression for  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity, *J. Magn. Reson., Series A* 102, (1993), 241-245
- Slichter C.P., Principles of Magnetic Resonance, *Springer Verlag, Berlin Heidelberg*, (1990)
- Smith L.J., Sutcliffe M.J., Redfield C., Dobson C.M., Analysis of  $\phi$   $\psi$  1 torsion angles for hen lysozyme in solution from  $^1\text{H}$  NMR spin-spin coupling constants, *Biochemistry* 30, (1991), 986-996
- Spiess H.W., Garrett B.B., Sheline R.K., Rabideau S.W., Oxygen-17 quadrupole coupling parameters for water and its various phases, *J. Chem. Phys.*, 51, 1969, 1201
- Spiess H.W., in P. Diehl, E. Fluck, R. Kosfeld, eds., NMR Basic Principles and Progress, *Springer Verlag, Berlin Heidelberg*, 15, (1978), 103
- Squires G.L. (1971), Messergebnisse und ihre Auswertung, De Gruyter Lehrbuch
- Stanley H.E., Buldyrev S.V., Canpolat M., Mishima O., Sadr-Lahijany M.R., Scala A., Starr F.W., The puzzling behaviour of water at very low temperature, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2, (2000), 1551-1558
- Stejskal E.O., Tanner J.E., Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time dependent field gradient, *J. Chem. Phys.*, 42, (1965), 288-292
- Strehlow H., Becker M., The pressure-jump method for the measurement of rates of ionic reactions, *Ber. Bunsenges.* 63, (1959), 457-461
- Tilton R.F., Dewan J.C., Petsko G.A., Effects of temperature on protein structure and dynamics: X-ray crystallographic studies of the protein ribonuclease-A at nine different temperatures from 98 K to 320 K, *Biochemistry* 31, (1992), 2469-2481
- Tjandra N., Bax A. Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science* 269, (1997), 842-850
- Tonello C., Kesenne S., Waechter M., Pascalisation of Delicatessen, in E. Ludwig, *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Springer-Verlag, (1999), 431
- Verhoeven J., Dymanus A., Bluysen H., Hyperfine structure of  $\text{HD}^{17}\text{O}$  by beam-maser spectroscopy, *J. Chem. Phys.*, 50, (1969), 3330
- Vogel W., Glaschemie, 3. Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg New York (1992) 411-422
- Vuister G.W., Bax A., Quantitative  $J$  correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond ( $J^{\text{HN}\alpha}$ ) coupling constants in  $^{15}\text{N}$ -enriched proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, (1993), 7772-7777
- Wagner G., Activation volumes for the rotational motion of interior aromatic rings in globular proteins determined by high resolution  $^1\text{H}$  NMR at various pressures. *FEBS Lett.* 112 (1980), 280-284.

- Wang H., Eberstadt M., Olejniczak E.T., Meadows R.P., Fesik S.W. A liquid crystalline medium for measuring residual dipolar couplings over a wide range of temperatures. *J. Biomol. NMR* 12, (1998), 443-446
- Welker C., Ein Kälteschockprotein aus *Thermotoga maritima*, *Dissertation Uni-Regensburg Naturwissenschaftliche Fakultät III*, (1999)
- Werbelow L.G., Grant D.M., Intramolecular dipolar relaxation in multispin systems, *Adv. Magn. Reson.* 9, (1977), 189
- Wishart D.S., Bigam C.G., Arne H., Hodges R.S., Sykes B.D.,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  random coil NMR shifts of the common amino acids. I. Investigation of nearest neighbour effects. *J. Biomol. NMR*, 5 (1995a), 67-81.
- Wishart D.S., Bigam C.G., Yao J., Abildgaard F., Dyson H.J., Oldfield E., Markley J.L., Sykes B.D.,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR*, 6 (1995b), 135-140.
- Wishart D.S., Sykes B.D., Richards F.M., Relationship between Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shift and Protein Secondary Structure, *Mol. Biol.* 222, (1991), 311-333.
- Woenckhaus J., Köhling R., Thiagarajan P., Littrell K.C. Seifert S., Royer C.A., Winter R., Pressure-Jump Small-Angle X-Ray Scattering Detected Kinetics of Staphylococcal Nuclease Folding., *Biophysical Journal*, 80, (2001), 1518-1523
- Woenckhaus J., Köhling R., Winter R., High pressure-jump apparatus for kinetic studies of protein folding reactions using the small-angle synchrotron x-ray scattering technique. *Rev. Sci. Instr.*, 71, 10, (2000), 3895-3899
- Wolynes P.G., Onuchic, J.N., Thirumalai D., Navigating the Folding Routes, *Science*, 267, (1995), 1619.
- Woolf L.A., Tracer diffusion of tritiated water (DTO) in heavy water ( $\text{D}_2\text{O}$ ) under pressure, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, 72, (1976), 1267-73
- Wüthrich K., *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*. North Holland Publishing Company, Amsterdam Oxford (1976).
- Wüthrich K., *NMR of proteins and nucleic acids*. John Wiley & Sons (1986).
- Yamada H., Nishikawa K., Honda M., Shimura T., Aksaka K., Tabayashi K., Pressure-resisting cell for high-pressure, high-resolution nuclear magnetic resonance measurement at very high magnetic fields, *Rev. Sci. Instr.* 72, (2001), 1463-1471
- Yamada H., Pressure-resisting glass cell for high pressure, high-resolution NMR measurements, *Rev. Sci. Instr.* 45 (1974), 540-542
- Yamaguchi T., Yamada H., Akasaka K., Thermodynamics of unfolding of ribonuclease-A under high pressure. a study by proton NMR, *J. Mol. Biol.* 250 (1995), 669-694.
- Yayanos A.A., The Properties of Deep-Sea Piezophilic Bacteria and Their Possible Uses in Biotechnology, in E. Ludwig, *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Springer-Verlag, (1999), 21-24
- Zheleznyi B.V., Density of supercooled water, *Zh. Fiz. Khim.* 43(9), (1969), 2343-2344
- Zwanzig R., Szabo A., Bagchi B. Levinthal's paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89, (1992) 20

## 8. Zusammenfassung

Als Grundlage aller NMR-Messungen unter Hochdruck galt es zunächst das von Lüdemann an der Universität-Regensburg eingeführte Hochdruck-Glaszellen-System an die Hochfeld Geräte DMX 500 und DRX 600 von Bruker anzupassen und neu zu konstruieren. Um größere Probenmengen vermessen zu können, wurde ein neues System auf Basis von Saphirzellen entwickelt und erfolgreich für hochauflösende NMR-Messungen eingesetzt. Zur Erweiterung der messtechnischen Möglichkeiten entstand eine automatische Druckbank, die in der Lage ist Drucksprünge auszulösen.

Um die Kenntnisse über das Verhalten von unterkühltem Wasser zu erweitern, wurden Messungen der Selbstdiffusion und  $T_1$ -Relaxation an den Isotopomeren des Wassers bei Drücken bis 400 MPa ausgeführt. Dabei konnte zum ersten Mal das Maximum der von  $T_1$ -Relaxation von D<sub>2</sub>O bei 250 MPa nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen an Biopolymeren befassten sich mit der Messung an einem Peptidmodellsystem zur Beschreibung des Verhaltens von entfalten Proteinen. Hier wurden Werte der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen der <sup>1</sup>H-Resonanzen in Proteinrückgrat und Seitenketten der Tetrapeptide Gly-Gly-X-Ala ermittelt. Wobei an Position X alle 20 Aminosäuren durchgetauscht wurden. Neben der Erstellung von Tabellen zu vergleichenden Untersuchungen mit den Daten gefalteter Proteine, konnte hier der Einfluss der Puffersysteme bei Hochdruckmessungen evaluiert werden.

Zur detaillierten Beschreibung des Einflusses von Druck und Temperatur auf das Verhalten der chemischen Verschiebungen und Signalvolumina wurden sehr umfangreiche Messungen mit mehr als 100 HSQC- und HNCQ-2D-Spektren am Kälteschockprotein *TmCsp* ausgeführt. Dabei wurde die sehr hohe Druckstabilität des Proteins *TmCsp* bei Drücken von 0,1 bis 200 MPa im Vergleich zu anderen Proteinen deutlich.

Bei Auftragung der linearen und quadratischen Koeffizienten von Polynomen zur Beschreibung des Temperaturverhaltens der chemischen Verschiebung wurde eine nahezu vollständige Korrelation beider Koeffizienten gefunden. Dieser Effekt konnte durch geeignete Reskalierungen als ein nicht thermodynamischer Effekt identifiziert werden.

Durch Anwendung des hohen Drucks konnten die Auswirkungen der reversiblen Tieftemperaturdenaturierung auf das Protein bei 200 MPa und einer minimalen Temperatur von 255 K studiert werden. Mit fallender Temperatur entstanden dabei neue Signale in den Spektren. Das Verhalten der chemischen Verschiebung dieser Signale zeigte stärkere Reaktionen auf Temperaturvariationen, als die Verschiebung nativ gefalteter Proteine.

Bei der Variation der Temperatur über den Bereich von 255 K – 340 K konnten signifikante Unterschiede in der Temperatur maximaler Stabilität der in  $\beta$ -Strängen und Schleifenregionen liegenden Aminosäuren von *TmCsp* aufgezeigt werden.

Durch das geringe Probenvolumen der Hochdruckkapillaren sind die Möglichkeiten zur Messung von NOE-Kontakten zur Strukturbestimmung begrenzt, daher wurden Restdipolkopplungen als Datenbasis der Berechnung einer Struktur von *TmCsp* bei 150 MPa und 333 K ermittelt. Zur Messung der Restdipolkopplungen musste zunächst die Druckstabilität der zur partiellen Orientierung des Proteins im Magnetfeld des Spektrometers notwendigen Phospholipidmischung nachgewiesen werden. Die Orientierung der verwendeten Lipidmischung zeigte eine mit steigender Temperatur zunehmende Druckstabilität, für Temperaturen oberhalb von 335 K war eine Druckstabilität bis 200 MPa gegeben.

Mit der Berechnung der *TmCsp*-Hochdruckstruktur konnten Effekte erklärt werden, deren Auswirkungen sich in den Untersuchungen der chemischen Verschiebung bei Druck- und Temperaturvariation zeigten.



## 9. Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei Prof. Dr. Dr. H.R. Kalbitzer und Prof. Dr. H.-D. Lüdemann für die Betreuung der Arbeit. Insbesondere danke ich Prof. Lüdemann für die detaillierte Einführung in die Hochdrucktechnik und die ständige Bereitschaft zur Diskussion über alle Themen der Arbeit. Auch Prof. Dr. E. Brunner gilt mein Dank für die gemeinsamen Messungen an den Phospholipiden und den Orientierungsmessungen an *TmCsp*.

Die Tetrapeptide wurden mit großer Sorgfalt von Frau Dr. A. Brunner am Klinikum hergestellt, die Qualitätskontrolle mittels Massenspektroskopie übernahm Herr E. Hochmuth. Nicht vergessen werden soll hier Herr E. Treml und die Mitarbeiter der Glaswerkstatt für die Anfertigung unzähliger Glaskapillaren. Auch Herrn G. Niesner und J. Gamez-Weingärtner von der Mechanikwerkstatt gebührt Dank für die Ausführung meiner Konstruktionen, ebenso Herrn G. Wühl von der Elektronikwerkstatt.

Für die Einführung in die Benutzung der Spektrometer und zahlreiche Diskussionen bedanke ich mich bei Herrn Dr. W. Kremer. Hier gilt mein besonderer Dank auch Herrn Dr. T. Groß für die Hilfe bei Messungen am MSL 300 Spektrometer zu Beginn meiner Arbeit.

Bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Kalbitzer und Lüdemann bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung bei Problemen jeglicher Art.

Regensburg, den 14.2.2002

## 10. Anhang

Im Folgenden sind die Daten aufgeführt, die in den betreffenden Kapiteln aus Platzgründen nicht aufgenommen werden konnten. Es handelt sich bei diesen Daten nicht um Rohdaten, die direkt aus den Spektren entnommen wurden, diese liegen nur in Form von EXCEL-Dateien vor und werden hier nicht gezeigt. Hier sind im Wesentlichen die Koeffizienten von linearen und quadratischen Näherungen der chemischen Verschiebungen, sowie der Signalvolumina zu finden. Zur Beurteilung der Datenqualität sind Fehlerangaben vorhanden.

### 10.1. Ergebnisse der Messung von $T_1$ und Diffusion an Wasser

$D [10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}]$					
	200 MPa	250 MPa	300 MPa	350 MPa	400 MPa
295 K	16,9	16,7	16,1	15,9	15,9
289 K	14,0	13,6	13,3	13,1	12,9
283 K	13,0	12,1	12	12,2	11,8
278 K	10,2	10,0	10,1	9,8	9,5
273 K	8,7	8,3	7,9	8,0	7,5
268 K	8,1	7,6	7,1	7,3	6,8
263 K	6,4	6,1	5,6	6,0	5,5
258 K	5,4	5,1	4,8	4,9	4,5
253 K	4,0	3,7	3,6	3,5	3,4
248 K	3,4	3,3	3,0	2,8	2,7
243 K	2,4	2,4	2,2	2,3	2,1
240 K	2,1	2,1	1,9	2,0	1,8
234 K	1,4	1,4	1,2	1,3	1,2

Tab.10.1. Die Selbstdiffusionskoeffizienten  $D [10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}]$  wurden mit der Spinecho-Technik mit gepulsten Feldgradienten gemessen (Stejskal & Tanner 1965). Pro Druck und Temperaturstufe wurden 16 1D-Spektren (128 Messungen, Speichertiefe 4 kByte) mit linear steigenden Strömen in den Gradientenspulen aufgenommen.

$T_1 [\text{ms}]$					
	200 MPa	250 MPa	300 MPa	350 MPa	400 MPa
283 K	350	330	330	330	320
273 K	265	250	250	240	240
263 K	180	190	185	190	180
257 K	134	140	145	145	140
253 K	107	116	118	116	116
248 K	91	94	96	95	93
242 K	67	77	76	74	71
239 K	56	59	58	60	56
233 K	41	43	44	45	42

Tab.10.2. Die Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1 [\text{ms}]$  von Deuterium in  $\text{D}_2\text{O}$  bei 76,8 MHz wurde mit der Inversion-Recovery Technik basierend auf 16 Stützstellen gemessen. Zur Optimierung der Messung bei kurzen  $T_1$ -Werten wurde eine Abtastzeit des ADC (Dwell Time DW) von 5  $\mu\text{s}$  verwendet.

$T_I$ [ms]				
	250 MPa	300 MPa	350 MPa	400 MPa
273 K	4,12	3,92	4,01	4,03
268 K	3,63	3,55	3,52	3,49
263 K	3,02	2,94	2,97	2,94
258 K	2,45	2,41	2,41	2,42
253 K	2,15	2,13	2,1	2,1
248 K	1,59	1,57	1,55	1,54
243 K	1,29	1,27	1,24	1,20
238 K	0,95	0,96	0,93	0,93
233 K	0,72	0,74	0,70	
229 K	0,59	0,57	0,58	0,55
222 K	0,41	0,39		

Tab.10.3.  $^{17}\text{O}$  Spin Gitter Relaxations Zeiten  $T_I$  [ms] von  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  bei 67,8MHz. Mit der Inversion Recovery Technik wurden 16 verschiedene Stützstellen vermessen. Die maximal mögliche Abtastrate des ADC im Spektrometer (Dwell-Time) lag bei 5  $\mu\text{s}$ .

$T_I$ [ms]					
	200 MPa	250 MPa	300 MPa	350 MPa	400 MPa
298 K	6,4	6,7	7,2	7,2	7,0
278 K	3,8	4,1	4,1	4,1	3,9
268 K	2,58	2,87	2,96	2,79	2,65
258 K	1,83	1,84	1,74	1,72	1,75
248 K	1,10	0,99	1,10	1,01	1,11
243 K		0,89	0,89	0,86	0,84
240 K		0,58	0,63	0,61	

Tab.10.4.  $^{17}\text{O}$  Spin Gitter Relaxations Zeiten  $T_I$  [ms] von  $\text{D}_2^{17}\text{O}$  bei 67.8 MHz. Mit der Inversion Recovery Technik wurden 16 verschiedene Stützstellen vermessen. Die maximal mögliche Abtastrate des ADC im Spektrometer (Dwell-Time) lag bei 5  $\mu\text{s}$ .

## 10.2. Tabellierte Daten von *TmCsp*

### 10.2.1. Druckabhängigkeit des Puffersystems

Aminosäure	Tris/HCl-Puffer		Phosphatpuffer	
	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]
form_M1	0,08 ±0,16	8,345 ±0,032	-0,04 ±0,02	8,349 ±0,003
R2	0,40 ±0,03	8,491 ±0,005	0,43 ±0,02	8,496 ±0,004
G3	0,33 ±0,03	8,706 ±0,006	0,35 ±0,01	8,706 ±0,003
K4	0,48 ±0,03	8,549 ±0,005	0,41 ±0,02	8,563 ±0,003
V5	0,76 ±0,04	9,071 ±0,008	0,76 ±0,01	9,074 ±0,002
K6	0,43 ±0,03	9,234 ±0,006	0,42 ±0,02	9,237 ±0,004
W7	0,16 ±0,03	7,543 ±0,006	0,19 ±0,01	7,543 ±0,003
F8	0,25 ±0,03	8,996 ±0,006	0,26 ±0,03	8,994 ±0,005
D9	0,40 ±0,03	8,008 ±0,006	0,48 ±0,02	8,017 ±0,004
K11	0,00 ±0,04	8,285 ±0,007	0,02 ±0,01	8,283 ±0,003
K12	0,02 ±0,04	7,743 ±0,007	0,05 ±0,02	7,746 ±0,003
G13	0,37 ±0,03	8,342 ±0,005	0,39 ±0,01	8,339 ±0,003
Y14	0,11 ±0,01	6,632 ±0,003	0,09 ±0,02	6,636 ±0,003
G15	-0,47 ±0,04	7,972 ±0,007	-0,45 ±0,01	7,971 ±0,003
F16	-0,63 ±0,06	7,941 ±0,011	-0,61 ±0,03	7,944 ±0,005
I17	0,29 ±0,06	9,306 ±0,011	0,28 ±0,02	9,309 ±0,003
T18	-0,11 ±0,03	9,335 ±0,006	-0,11 ±0,02	9,337 ±0,004
K19	0,66 ±0,08	9,409 ±0,015	0,65 ±0,02	9,418 ±0,004
D20	0,82 ±0,03	8,990 ±0,005	0,84 ±0,01	8,990 ±0,002
E21	0,46 ±0,31	8,428 ±0,061	0,07 ±0,01	8,464 ±0,002
G22	-0,24 ±0,04	7,812 ±0,008	-0,26 ±0,02	7,811 ±0,003
G23	0,11 ±0,02	8,302 ±0,004	0,18 ±0,01	8,299 ±0,002
D24	0,68 ±0,02	8,374 ±0,003	0,69 ±0,03	8,378 ±0,005
V25	-0,10 ±0,05	9,774 ±0,009	-0,10 ±0,03	9,776 ±0,005
F26	0,23 ±0,02	8,495 ±0,005	0,26 ±0,01	8,492 ±0,002
V27	-0,04 ±0,04	7,695 ±0,007	-0,02 ±0,02	7,694 ±0,004
H28	0,53 ±0,02	8,671 ±0,005	0,59 ±0,02	8,667 ±0,004
W29	0,36 ±0,03	8,126 ±0,006	0,44 ±0,01	8,134 ±0,002
S30	-1,17 ±0,05	7,251 ±0,009	-1,17 ±0,02	7,254 ±0,005
A31	-0,32 ±0,03	7,963 ±0,006	-0,29 ±0,02	7,966 ±0,003
I32	0,03 ±0,04	7,334 ±0,008	0,05 ±0,02	7,338 ±0,003
E33	0,29 ±0,03	9,244 ±0,006	0,31 ±0,03	9,250 ±0,006
M34	0,92 ±0,12	7,436 ±0,023	0,97 ±0,02	7,424 ±0,004
E35	0,12 ±0,19	8,630 ±0,036	0,08 ±0,01	8,642 ±0,002
G36	-0,03 ±0,16	8,511 ±0,030	-0,03 ±0,02	8,539 ±0,003
F37	0,76 ±0,03	8,047 ±0,006	0,77 ±0,02	8,041 ±0,004
T39	0,63 ±0,03	7,368 ±0,006	0,66 ±0,01	7,359 ±0,002
L40	-0,62 ±0,05	5,903 ±0,009	-0,54 ±0,01	5,885 ±0,003
K41	-0,29 ±0,03	8,260 ±0,007	-0,26 ±0,02	8,251 ±0,004
E42	0,11 ±0,05	8,710 ±0,009	0,17 ±0,01	8,708 ±0,003
G43	0,33 ±0,03	9,045 ±0,005	0,37 ±0,01	9,043 ±0,002
Q44	0,03 ±0,03	7,724 ±0,005	0,04 ±0,01	7,725 ±0,002
V45	0,39 ±0,03	8,835 ±0,006	0,39 ±0,01	8,835 ±0,002
V46	-0,06 ±0,07	8,407 ±0,013	-0,03 ±0,07	8,409 ±0,013
E47	0,74 ±0,03	9,019 ±0,006	0,76 ±0,03	9,016 ±0,005
F48	0,20 ±0,03	8,483 ±0,006	0,22 ±0,01	8,479 ±0,003
E49	0,13 ±0,04	8,817 ±0,008	0,09 ±0,03	8,813 ±0,005

I50	0,43 ±0,03	8,807 ±0,006	0,45 ±0,02	8,802 ±0,003
Q51	0,34 ±0,04	9,166 ±0,008	0,40 ±0,05	9,166 ±0,010
E52	0,39 ±0,06	8,773 ±0,011	0,42 ±0,01	8,775 ±0,002
G53	0,65 ±0,03	7,879 ±0,005	0,71 ±0,02	7,874 ±0,003
K55	0,47 ±0,43	8,335 ±0,083	0,59 ±0,34	8,356 ±0,066
G56	0,05 ±0,02	7,385 ±0,003	0,05 ±0,04	7,388 ±0,008
Q58	-0,08 ±0,05	9,024 ±0,009	-0,10 ±0,01	9,023 ±0,002
A59	0,90 ±0,03	8,840 ±0,007	0,90 ±0,02	8,843 ±0,003
A60	0,18 ±0,04	9,242 ±0,007	0,23 ±0,02	9,241 ±0,003
H61	0,02 ±0,03	9,112 ±0,007	0,17 ±0,01	9,148 ±0,002
V62	0,42 ±0,02	8,333 ±0,005	0,44 ±0,05	8,346 ±0,009
K63	0,66 ±0,06	9,185 ±0,011	0,65 ±0,02	9,182 ±0,003
V64	1,31 ±0,02	8,314 ±0,004	1,34 ±0,03	8,292 ±0,006
V65	0,11 ±0,03	8,608 ±0,005	0,13 ±0,02	8,606 ±0,004
E66	0,71 ±0,02	7,869 ±0,003	0,76 ±0,02	7,864 ±0,003

Tab.10.5. Die Tabelle zeigt die linearen und konstanten Koeffizienten der Regressionsanalyse der druckabhängigen chemischen Verschiebungen der  $H^N$ -Signale der Amidbindungen in *TmCsp* von Normaldruck bis 200 MPa bei 303 K in Tris/HCl- und Phosphatpuffer.

Aminosäure	Tris/HCl-Puffer		Phosphatpuffer	
	$\delta_1^{N^*}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{N^*}$ [ppm]	$\delta_1^{N^*}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{N^*}$ [ppm]
form_M1	0,6 ±0,4	128,91 ±0,07	0,2 ±0,1	128,95 ±0,02
R2	-0,4 ±0,1	121,01 ±0,03	-0,3 ±0,1	121,06 ±0,01
G3	2,8 ±0,2	109,15 ±0,03	2,9 ±0,1	109,15 ±0,02
K4	6,7 ±0,2	120,03 ±0,05	6,4 ±0,0	120,08 ±0,00
V5	6,5 ±0,2	123,95 ±0,03	6,5 ±0,1	123,99 ±0,02
K6	3,5 ±0,4	136,29 ±0,07	3,4 ±0,2	136,32 ±0,03
W7	1,0 ±0,2	111,24 ±0,03	1,0 ±0,1	111,28 ±0,02
F8	1,7 ±0,2	121,32 ±0,04	1,5 ±0,1	121,32 ±0,01
D9	2,3 ±0,3	128,84 ±0,05	2,4 ±0,1	128,89 ±0,02
K11	2,3 ±0,2	122,00 ±0,04	2,0 ±0,1	122,06 ±0,02
K12	1,9 ±0,1	117,98 ±0,03	1,9 ±0,1	118,00 ±0,01
G13	3,3 ±0,2	107,15 ±0,04	3,4 ±0,2	107,18 ±0,04
Y14	1,7 ±0,2	112,30 ±0,04	2,0 ±0,1	112,30 ±0,02
G15	0,6 ±0,2	104,77 ±0,05	0,8 ±0,2	104,75 ±0,04
F16	2,6 ±0,1	114,96 ±0,03	2,8 ±0,1	114,99 ±0,02
I17	-1,2 ±0,2	122,66 ±0,03	-1,4 ±0,1	122,70 ±0,02
T18	1,1 ±0,2	125,02 ±0,04	1,0 ±0,1	125,05 ±0,01
K19	5,9 ±0,3	130,42 ±0,06	5,9 ±0,1	130,42 ±0,02
D20	5,4 ±0,2	126,54 ±0,04	5,2 ±0,1	126,57 ±0,02
E21	2,6 ±0,5	114,52 ±0,09	1,0 ±0,1	114,64 ±0,02
G22	2,1 ±0,2	110,90 ±0,05	2,4 ±0,1	110,89 ±0,02
G23	3,2 ±0,2	111,85 ±0,03	3,6 ±0,1	111,86 ±0,02
D24	-2,6 ±0,2	120,59 ±0,03	-2,7 ±0,1	120,60 ±0,02
V25	0,8 ±0,2	120,42 ±0,04	0,9 ±0,2	120,38 ±0,03
F26	4,6 ±0,2	130,31 ±0,05	4,3 ±0,1	130,32 ±0,02
V27	0,5 ±0,2	124,25 ±0,04	0,4 ±0,1	124,26 ±0,01
H28	1,7 ±0,3	127,94 ±0,06	1,3 ±0,2	127,95 ±0,03
W29	0,8 ±0,2	124,13 ±0,03	0,7 ±0,1	124,15 ±0,02
S30	0,8 ±0,2	117,08 ±0,04	0,6 ±0,1	117,15 ±0,01
A31	1,7 ±0,2	125,02 ±0,04	1,9 ±0,1	125,01 ±0,02
I32	2,4 ±0,1	118,23 ±0,02	2,4 ±0,1	118,26 ±0,01
E33	-2,5 ±0,4	132,11 ±0,07	-2,5 ±0,1	132,22 ±0,02

M34	5,6 ±0,6	120,00 ±0,11	5,9 ±0,2	119,88 ±0,03
E35	-0,2 ±0,9	122,57 ±0,18	-1,7 ±0,1	122,66 ±0,02
G36	0,9 ±1,2	110,55 ±0,24	1,8 ±0,2	110,38 ±0,04
F37	4,6 ±0,3	121,78 ±0,06	4,9 ±0,2	121,69 ±0,03
T39	8,5 ±0,3	115,15 ±0,06	8,8 ±0,3	114,99 ±0,06
L40	1,7 ±0,1	120,27 ±0,02	1,9 ±0,1	120,23 ±0,01
K41	-1,0 ±0,2	118,65 ±0,04	-0,9 ±0,1	118,63 ±0,01
E42	1,9 ±0,2	121,84 ±0,03	2,0 ±0,1	121,84 ±0,01
G43	5,0 ±0,1	113,04 ±0,03	4,9 ±0,1	113,06 ±0,02
Q44	2,2 ±0,1	118,97 ±0,02	2,1 ±0,1	119,01 ±0,01
V45	3,0 ±0,1	125,45 ±0,03	3,0 ±0,1	125,45 ±0,02
V46	2,2 ±0,3	117,66 ±0,06	2,2 ±0,3	117,66 ±0,05
E47	-2,6 ±0,3	120,95 ±0,06	-2,7 ±0,2	121,02 ±0,04
F48	3,1 ±0,1	117,81 ±0,02	3,3 ±0,0	117,78 ±0,00
E49	0,8 ±0,2	117,80 ±0,04	0,6 ±0,1	117,85 ±0,01
I50	0,9 ±0,2	120,99 ±0,03	1,0 ±0,1	121,03 ±0,01
Q51	2,7 ±0,5	126,79 ±0,09	2,7 ±0,2	126,84 ±0,04
E52	2,5 ±0,4	124,31 ±0,08	2,5 ±0,1	124,39 ±0,02
G53	3,3 ±0,1	112,74 ±0,02	3,2 ±0,2	112,70 ±0,03
K55	1,0 ±0,8	116,75 ±0,14	2,5 ±0,6	116,68 ±0,12
G56	3,2 ±0,2	108,44 ±0,04	2,8 ±0,3	108,51 ±0,05
Q58	1,8 ±0,2	119,75 ±0,04	1,3 ±0,1	119,80 ±0,02
A59	2,6 ±0,1	123,25 ±0,02	2,7 ±0,1	123,26 ±0,02
A60	3,0 ±0,1	123,38 ±0,02	2,6 ±0,1	123,32 ±0,01
H61	4,8 ±0,2	117,90 ±0,03	4,3 ±0,1	117,78 ±0,02
V62	0,3 ±0,4	118,00 ±0,09	0,4 ±0,4	118,00 ±0,07
K63	4,5 ±0,5	126,75 ±0,09	4,3 ±0,2	126,78 ±0,04
V64	4,0 ±0,1	123,37 ±0,02	4,0 ±0,1	123,39 ±0,01
V65	0,6 ±0,2	127,81 ±0,03	0,9 ±0,1	127,76 ±0,02
E66	2,2 ±0,2	128,50 ±0,04	2,2 ±0,1	128,51 ±0,02

Tab.10.6. Die Tabelle zeigt die linearen und konstanten Koeffizienten der Regressionsanalyse der druckabhängigen chemischen Verschiebungen der  $^{15}\text{N}^{\epsilon}$ -Signale der Amidbindungen in *TmCsp* von Normaldruck bis 200 MPa bei 303 K in Tris/HCl- und Phosphatpuffer.

Aminosäure	Tris/HCl-Puffer		Phosphatpuffer	
	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]
W7 H <sup>ε1</sup>	0,13 ±0,04	10,397 ±0,007	0,13 ±0,01	10,395 ±0,003
W29 H <sup>ε1</sup>	0,05 ±0,05	10,305 ±0,010	0,02 ±0,02	10,342 ±0,004
Q44 H <sup>ε22</sup>	0,35 ±0,03	6,754 ±0,005	0,37 ±0,01	6,767 ±0,002
Q44 H <sup>ε21</sup>	0,16 ±0,02	7,420 ±0,004	0,17 ±0,01	7,418 ±0,002
Q51 H <sup>ε22</sup>	0,43 ±0,03	6,818 ±0,005	0,46 ±0,01	6,823 ±0,002
Q51 H <sup>ε21</sup>	0,17 ±0,03	7,495 ±0,006	0,18 ±0,01	7,485 ±0,002
Q58 H <sup>ε22</sup>	0,62 ±0,02	6,659 ±0,004	0,65 ±0,03	6,651 ±0,006
Q58 H <sup>ε21</sup>	-0,03 ±0,03	7,730 ±0,005	0,00 ±0,01	7,725 ±0,002

Tab.10.7. Die Tabelle zeigt die linearen und konstanten Koeffizienten der Regressionsanalyse der druckabhängigen chemischen Verschiebungen der beobachtbaren H<sup>N</sup>-Signale in den Seitenketten in *TmCsp* von Normaldruck bis 200 MPa bei 303 K in Tris/HCl- und Phosphatpuffer.

Aminosäure	Tris/HCl-Puffer		Phosphatpuffer	
	$\delta_1^{\text{N}^c}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{N}^c}$ [ppm]	$\delta_1^{\text{N}^c}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{N}^c}$ [ppm]
W7 Hε1	3,1 ±0,3	130,03 ±0,05	3,2 ±0,1	130,04 ±0,02
W29 Hε1	3,4 ±0,4	130,50 ±0,08	3,0 ±0,1	130,63 ±0,02
Q44 H <sup>ε22</sup>	7,0 ±0,2	111,62 ±0,04	7,1 ±0,2	111,61 ±0,04
Q44 H <sup>ε21</sup>	7,0 ±0,2	111,61 ±0,03	7,3 ±0,2	111,60 ±0,03
Q51 H <sup>ε22</sup>	6,8 ±0,2	111,48 ±0,04	7,1 ±0,1	111,47 ±0,02
Q51 H <sup>ε21</sup>	7,0 ±0,1	111,46 ±0,02	7,1 ±0,1	111,47 ±0,02
Q58 H <sup>ε22</sup>	6,2 ±0,1	112,18 ±0,02	6,4 ±0,1	112,13 ±0,03
Q58 H <sup>ε21</sup>	6,3 ±0,1	112,16 ±0,03	6,6 ±0,2	112,10 ±0,04

Tab.10.8. Die Tabelle zeigt die linearen und konstanten Koeffizienten der Regressionsanalyse der druckabhängigen chemischen Verschiebungen der beobachtbaren <sup>15</sup>N<sup>c</sup>-Signale in den Seitenketten in *TmCsp* von Normaldruck bis 200 MPa bei 303 K in Tris/HCl- und Phosphatpuffer.

### 10.2.2. Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung

Amino- säure	$\delta_2^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-2</sup> ]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]
Max.	1,4	1,4	9,8
Min.	-2,0	-1,4	5,9
Mwt.	0,0	0,1	8,5
Stdabw.	0,6	0,5	0,7
form.M1	0,3 ± 0,2	-0,29 ± 0,03	8,394 ± 0,001
R2	-0,1 ± 0,1	0,27 ± 0,02	8,540 ± 0,001
G3	0,2 ± 0,2	0,14 ± 0,04	8,750 ± 0,002
K4	0,5 ± 0,2	0,14 ± 0,04	8,609 ± 0,002
V5	0,3 ± 0,1	0,52 ± 0,02	9,119 ± 0,001
K6	-0,2 ± 0,3	0,30 ± 0,07	9,279 ± 0,003
W7	0,0 ± 0,2	0,01 ± 0,04	7,586 ± 0,002
F8	0,1 ± 0,2	0,11 ± 0,04	9,037 ± 0,002
D9	-0,3 ± 0,2	0,37 ± 0,03	8,058 ± 0,001
S10	-0,9 ± 0,5	1,10 ± 0,10	9,134 ± 0,004
K11	0,2 ± 0,2	-0,19 ± 0,04	8,327 ± 0,002
K12	0,5 ± 0,1	-0,21 ± 0,02	7,792 ± 0,001
G13	-0,2 ± 0,1	0,26 ± 0,02	8,380 ± 0,001
Y14	0,0 ± 0,1	-0,05 ± 0,02	6,678 ± 0,001
G15	0,6 ± 0,2	-0,73 ± 0,04	8,017 ± 0,002
F16	1,4 ± 0,1	-1,04 ± 0,03	7,994 ± 0,001
I17	0,5 ± 0,3	0,02 ± 0,06	9,356 ± 0,003
T18	0,1 ± 0,2	-0,29 ± 0,03	9,380 ± 0,001
K19	-0,6 ± 0,2	0,59 ± 0,04	9,458 ± 0,002
D20	-0,2 ± 0,1	0,70 ± 0,02	9,032 ± 0,001
E21	0,5 ± 0,2	-0,22 ± 0,03	8,511 ± 0,001
G22	0,8 ± 0,2	-0,57 ± 0,04	7,857 ± 0,002
G23	-0,1 ± 0,2	0,04 ± 0,04	8,341 ± 0,002
D24	-0,7 ± 0,1	0,66 ± 0,02	8,417 ± 0,001
V25	-0,6 ± 0,2	-0,13 ± 0,03	9,814 ± 0,001
F26	0,1 ± 0,1	0,06 ± 0,02	8,535 ± 0,001
V27	0,1 ± 0,1	-0,21 ± 0,03	7,739 ± 0,001
H28	-0,6 ± 0,1	0,53 ± 0,03	8,706 ± 0,001
W29	-0,1 ± 0,1	0,28 ± 0,02	8,177 ± 0,001
S30	0,5 ± 0,2	-1,43 ± 0,05	7,301 ± 0,002
A31	-0,1 ± 0,1	-0,44 ± 0,03	8,009 ± 0,001
I32	0,2 ± 0,2	-0,16 ± 0,04	7,382 ± 0,002
E33	-0,9 ± 0,1	0,33 ± 0,02	9,286 ± 0,001
M34	0,3 ± 0,2	0,74 ± 0,04	7,468 ± 0,002
E35	0,2 ± 0,2	-0,14 ± 0,04	8,686 ± 0,002
G36	0,3 ± 0,2	-0,26 ± 0,03	8,583 ± 0,001
F37	-0,7 ± 0,1	0,74 ± 0,03	8,080 ± 0,001
K38	0,5 ± 0,3	-0,52 ± 0,06	8,180 ± 0,003
T39	0,4 ± 0,1	0,40 ± 0,03	7,405 ± 0,001
L40	0,9 ± 0,2	-0,87 ± 0,03	5,933 ± 0,001
K41	0,4 ± 0,2	-0,51 ± 0,04	8,296 ± 0,002
E42	0,7 ± 0,1	-0,15 ± 0,02	8,755 ± 0,001
G43	0,1 ± 0,2	0,18 ± 0,03	9,086 ± 0,001
Q44	0,0 ± 0,1	-0,13 ± 0,02	7,769 ± 0,001
V45	0,2 ± 0,2	0,18 ± 0,04	8,879 ± 0,002
V46	0,4 ± 0,9	-0,24 ± 0,19	8,453 ± 0,008
E47	-1,0 ± 0,2	0,78 ± 0,04	9,052 ± 0,002



F48	0,2 ± 0,1	0,02 ± 0,03	8,523 ± 0,001
E49	-0,2 ± 0,2	-0,02 ± 0,04	8,855 ± 0,002
I50	0,0 ± 0,2	0,29 ± 0,04	8,844 ± 0,002
Q51	-2,0 ± 0,4	0,62 ± 0,08	9,197 ± 0,004
E52	0,1 ± 0,2	0,22 ± 0,03	8,819 ± 0,001
Q58	0,1 ± 0,2	-0,29 ± 0,04	9,066 ± 0,002
A59	-0,3 ± 0,3	0,79 ± 0,05	8,883 ± 0,002
A60	-0,1 ± 0,1	0,08 ± 0,02	9,284 ± 0,001
H61	-0,3 ± 0,1	0,04 ± 0,03	9,189 ± 0,001
V62	-0,4 ± 1,0	0,30 ± 0,21	8,389 ± 0,009
K63	0,0 ± 0,4	0,48 ± 0,08	9,225 ± 0,003
V64	-1,2 ± 0,2	1,40 ± 0,04	8,328 ± 0,002
V65	-0,6 ± 0,1	0,06 ± 0,02	8,647 ± 0,001
E66	-0,6 ± 0,1	0,69 ± 0,03	7,904 ± 0,001

Tab.10.8. Quadratische Koeffizienten der druckabhängigen chemischen Verschiebung der  $H^N$ -Protonen in *TmCsp* im Druckbereich von Normaldruck bis 200 MPa. Fehlende Werte sind aufgrund von Austauschverbreiterung nicht sichtbar (303 K Phosphatpuffer).

Amino- säure	$\delta_2^{N^*}$ [ppm GPa <sup>-2</sup> ]	$\delta_1^{N^*}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{N^*}$ [ppm]
Max.	8,5	10,6	136,4
Min.	-11,1	-4,7	104,8
Mwt.	-1,2	2,3	121,1
Stdabw.	3,7	2,8	6,3
form.M1	1,8 ± 1,9	-0,34 ± 0,40	129,040 ± 0,017
R2	1,7 ± 1,0	-0,78 ± 0,22	121,133 ± 0,009
G3	-0,3 ± 1,2	2,63 ± 0,24	109,212 ± 0,010
K4	-1,8 ± 0,9	6,52 ± 0,18	120,146 ± 0,008
V5	0,0 ± 0,0	6,26 ± 0,01	124,057 ± 0,000
K6	-4,9 ± 1,3	4,30 ± 0,28	136,364 ± 0,012
W7	2,1 ± 1,3	0,24 ± 0,27	111,351 ± 0,012
F8	0,0 ± 1,4	1,35 ± 0,29	121,382 ± 0,013
D9	-0,7 ± 1,1	2,63 ± 0,23	128,943 ± 0,010
S10	-1,0 ± 4,2	2,94 ± 0,86	122,020 ± 0,037
K11	-3,1 ± 1,5	2,49 ± 0,31	122,115 ± 0,013
K12	-3,8 ± 0,9	2,32 ± 0,20	118,048 ± 0,008
G13	-4,2 ± 1,3	3,92 ± 0,26	107,217 ± 0,011
G15	-0,7 ± 1,3	0,60 ± 0,27	104,807 ± 0,011
F16	3,0 ± 1,0	1,91 ± 0,20	115,072 ± 0,009
I17	0,0 ± 0,0	-1,56 ± 0,00	122,767 ± 0,000
T18	-2,5 ± 1,2	1,34 ± 0,24	125,109 ± 0,010
K19	-0,6 ± 1,3	5,91 ± 0,27	130,490 ± 0,011
D20	0,0 ± 1,3	5,05 ± 0,26	126,638 ± 0,011
E21	1,2 ± 1,3	0,59 ± 0,27	114,709 ± 0,012
G22	-1,4 ± 1,3	2,36 ± 0,26	110,939 ± 0,011
G23	-3,8 ± 1,2	4,01 ± 0,26	111,894 ± 0,011
D24	-1,4 ± 1,5	-2,50 ± 0,31	120,668 ± 0,013
V25	-5,4 ± 0,7	1,86 ± 0,15	120,422 ± 0,006
F26	-0,3 ± 1,0	4,36 ± 0,21	130,390 ± 0,009
V27	-1,8 ± 0,9	0,60 ± 0,19	124,322 ± 0,008
H28	-3,8 ± 0,8	1,98 ± 0,17	127,997 ± 0,007
W29	-0,2 ± 1,2	0,59 ± 0,24	124,223 ± 0,010
S30	-2,0 ± 1,4	0,66 ± 0,29	117,217 ± 0,013

A31	-2,4 ± 0,8	2,23 ± 0,16	125,071 ± 0,007
I32	-0,8 ± 1,2	2,32 ± 0,25	118,319 ± 0,011
E33	0,0 ± 1,1	-2,66 ± 0,23	132,293 ± 0,010
M34	-3,6 ± 1,1	6,42 ± 0,22	119,914 ± 0,010
E35	5,6 ± 0,9	-2,91 ± 0,19	122,767 ± 0,008
G36	-1,1 ± 1,3	1,76 ± 0,26	110,423 ± 0,011
F37	-9,9 ± 1,1	6,66 ± 0,22	121,712 ± 0,009
K38	-9,3 ± 0,9	9,15 ± 0,18	124,996 ± 0,008
T39	-10,1 ± 1,4	10,62 ± 0,29	114,986 ± 0,012
L40	0,0 ± 0,0	1,56 ± 0,00	120,306 ± 0,000
K41	3,0 ± 1,0	-1,63 ± 0,21	118,706 ± 0,009
E42	-2,4 ± 0,8	2,21 ± 0,16	121,907 ± 0,007
G43	-3,3 ± 1,4	5,24 ± 0,29	113,109 ± 0,012
Q44	-1,2 ± 1,1	2,17 ± 0,24	119,065 ± 0,010
V45	2,6 ± 1,0	2,25 ± 0,20	125,537 ± 0,009
V46	-4,9 ± 5,8	3,12 ± 1,21	117,694 ± 0,052
E47	8,5 ± 2,1	-4,70 ± 0,43	121,142 ± 0,018
F48	1,4 ± 1,3	2,84 ± 0,26	117,849 ± 0,011
E49	2,6 ± 1,0	-0,15 ± 0,20	117,924 ± 0,009
I50	-2,5 ± 1,2	1,34 ± 0,24	121,085 ± 0,010
Q51	-11,1 ± 1,6	4,83 ± 0,33	126,849 ± 0,014
E52	-1,2 ± 1,2	2,50 ± 0,24	124,453 ± 0,010
Q58	0,1 ± 1,3	1,20 ± 0,26	119,863 ± 0,011
A59	1,1 ± 1,2	2,20 ± 0,24	123,348 ± 0,010
A60	-0,6 ± 1,6	2,62 ± 0,34	123,378 ± 0,015
H61	-1,6 ± 1,6	4,42 ± 0,33	117,839 ± 0,014
V62	5,9 ± 5,7	-1,20 ± 1,18	118,091 ± 0,051
K63	7,2 ± 1,3	2,69 ± 0,26	126,910 ± 0,011
V64	-1,2 ± 1,1	4,04 ± 0,23	123,462 ± 0,010
V65	-3,0 ± 1,3	1,26 ± 0,28	127,816 ± 0,012
E66	-5,0 ± 1,4	3,06 ± 0,29	128,545 ± 0,012

Tab.10.9. Quadratische Koeffizienten der druckabhängigen chemischen Verschiebung der  $^{15}\text{N}^{\epsilon}$ -Atome in *TmCsp*, im Druckbereich von Normaldruck bis 200 MPa. Fehlende Werte sind aufgrund von Austauschverbreiterung nicht sichtbar (303 K Phosphatpuffer).

Amino-säure	$\delta_2^{\text{C}^{\epsilon}}$ [ppm GPa <sup>-2</sup> ]	$\delta_1^{\text{C}^{\epsilon}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{C}^{\epsilon}}$ [ppm]
Max.	4,9	2,0	178,6
Min.	-4,4	-4,2	170,0
Mwt.	0,6	-0,1	174,8
Stdabw.	1,7	0,9	2,0
R2	2,1 ± 0,7	-1,03 ± 0,14	170,631 ± 0,006
G3	1,1 ± 1,3	1,05 ± 0,27	176,464 ± 0,012
K4	-0,7 ± 1,3	0,64 ± 0,27	171,640 ± 0,011
V5	0,2 ± 0,2	0,14 ± 0,04	176,232 ± 0,002
K6	1,2 ± 1,0	-0,38 ± 0,22	175,616 ± 0,009
F8	2,1 ± 0,8	-1,41 ± 0,17	173,549 ± 0,007
D9	-1,6 ± 0,8	0,37 ± 0,16	172,411 ± 0,007
K11	-0,7 ± 1,3	0,64 ± 0,28	175,555 ± 0,012
K12	-1,6 ± 1,0	1,27 ± 0,21	178,631 ± 0,009
G13	-0,7 ± 1,3	0,64 ± 0,27	177,690 ± 0,012
Y14	1,2 ± 1,2	0,78 ± 0,26	172,219 ± 0,011
G15	2,1 ± 0,7	-1,67 ± 0,14	171,732 ± 0,006

F16	0,3 ± 0,1	0,77 ± 0,03	170,570 ± 0,001
I17	3,0 ± 1,6	-0,37 ± 0,34	174,576 ± 0,014
T18	3,0 ± 0,7	-0,09 ± 0,15	174,680 ± 0,007
K19	-0,7 ± 1,3	-0,02 ± 0,27	175,717 ± 0,011
D20	0,2 ± 0,2	-0,51 ± 0,03	177,980 ± 0,001
E21	-1,6 ± 0,8	0,36 ± 0,17	178,333 ± 0,007
G22	2,1 ± 0,9	-0,76 ± 0,19	176,041 ± 0,008
G23	0,3 ± 1,5	1,15 ± 0,31	173,444 ± 0,013
D24	-0,7 ± 1,0	0,51 ± 0,22	172,118 ± 0,009
V25	-1,6 ± 1,0	-0,67 ± 0,21	177,466 ± 0,009
F26	4,9 ± 1,0	-4,23 ± 0,20	173,389 ± 0,008
V27	2,0 ± 0,7	-1,01 ± 0,14	172,605 ± 0,006
H28	0,2 ± 0,2	0,14 ± 0,04	169,987 ± 0,002
W29	-1,5 ± 1,0	0,61 ± 0,20	176,884 ± 0,008
S30	0,2 ± 0,2	0,77 ± 0,04	176,912 ± 0,002
A31	-1,8 ± 0,8	1,06 ± 0,16	174,870 ± 0,007
I32	3,0 ± 0,7	-0,09 ± 0,15	176,589 ± 0,007
M34	1,1 ± 1,1	-0,37 ± 0,22	174,871 ± 0,009
E35	2,0 ± 0,7	-1,66 ± 0,15	174,643 ± 0,006
G36	-0,7 ± 1,3	-0,01 ± 0,27	177,011 ± 0,012
F37	0,2 ± 0,1	0,13 ± 0,03	173,773 ± 0,001
K38	-0,7 ± 1,3	-0,01 ± 0,27	175,490 ± 0,012
T39	3,9 ± 1,7	-0,74 ± 0,36	174,128 ± 0,015
L40	3,0 ± 0,8	-1,39 ± 0,16	171,153 ± 0,007
K41	2,1 ± 0,7	-1,03 ± 0,14	174,352 ± 0,006
E42	0,3 ± 0,1	-0,52 ± 0,01	175,100 ± 0,000
G43	0,3 ± 1,5	0,51 ± 0,31	176,840 ± 0,013
Q44	1,1 ± 1,0	0,27 ± 0,21	174,515 ± 0,009
V45	-0,7 ± 1,3	1,29 ± 0,27	175,490 ± 0,011
V46	0,3 ± 0,2	0,12 ± 0,04	175,909 ± 0,002
E47	-0,7 ± 1,3	-0,01 ± 0,27	174,131 ± 0,012
F48	1,1 ± 1,3	-0,25 ± 0,28	175,299 ± 0,012
E49	0,8 ± 1,0	-0,33 ± 0,20	172,449 ± 0,008
I50	3,0 ± 1,6	-1,01 ± 0,33	175,483 ± 0,014
Q51	1,2 ± 1,0	-1,03 ± 0,22	175,163 ± 0,009
E52	0,2 ± 1,4	0,52 ± 0,30	174,770 ± 0,012
G53	0,2 ± 0,1	0,13 ± 0,03	176,394 ± 0,001
K54	0,3 ± 0,1	-0,52 ± 0,01	175,100 ± 0,000
G56	0,2 ± 0,1	0,13 ± 0,03	175,941 ± 0,001
Q58	-0,7 ± 1,3	-0,01 ± 0,27	176,817 ± 0,012
A59	0,2 ± 0,1	0,13 ± 0,02	173,513 ± 0,001
A60	-0,7 ± 1,0	-0,15 ± 0,21	176,001 ± 0,009
H61	0,2 ± 0,2	-0,51 ± 0,03	175,456 ± 0,001
V62	3,9 ± 1,8	-0,48 ± 0,38	173,456 ± 0,016
K63	2,1 ± 0,9	-0,12 ± 0,18	175,912 ± 0,008
V64	1,2 ± 1,2	0,78 ± 0,25	175,519 ± 0,011
V65	-4,4 ± 1,9	2,02 ± 0,39	176,624 ± 0,016
E66	0,2 ± 0,2	0,13 ± 0,04	174,809 ± 0,001

Tab.10.10. Quadratische Koeffizienten der druckabhängigen chemischen Verschiebung der  $^{13}\text{C}$ -Atome in *TmCsp*, im Druckbereich von Normaldruck bis 200 MPa. Fehlende Werte sind aufgrund von Austauschverbreiterung nicht sichtbar (303 K Phosphatpuffer).

Amino- säure	$\delta_2^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-2</sup> ]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]
W7 H $\epsilon$ 1	0,0 $\pm$ 0,1	-0,03 $\pm$ 0,03	10,438 $\pm$ 0,001
W29 H $\epsilon$ 1	0,5 $\pm$ 0,2	-0,25 $\pm$ 0,03	10,389 $\pm$ 0,001
Q44 H $\epsilon^{22}$	0,1 $\pm$ 0,1	0,19 $\pm$ 0,03	6,810 $\pm$ 0,001
Q44 H $\epsilon^{21}$	0,0 $\pm$ 0,1	-0,01 $\pm$ 0,02	7,462 $\pm$ 0,001
Q51 H $\epsilon^{22}$	-0,1 $\pm$ 0,1	0,31 $\pm$ 0,03	6,865 $\pm$ 0,001
Q51 H $\epsilon^{21}$	0,0 $\pm$ 0,2	0,01 $\pm$ 0,03	7,528 $\pm$ 0,001
Q58 H $\epsilon^{22}$	-1,1 $\pm$ 0,1	0,69 $\pm$ 0,02	6,687 $\pm$ 0,001
Q58 H $\epsilon^{21}$	0,1 $\pm$ 0,1	-0,20 $\pm$ 0,03	7,769 $\pm$ 0,001

Tab.10.11. Quadratische Koeffizienten der druckabhängigen chemischen Verschiebung der Seitenketten-H<sup>N</sup>-Protonen in *TmCsp* im Druckbereich von Normaldruck bis 200 MPa (303 K Phosphatpuffer).

Amino- säure	$\delta_2^{\text{N}^*}$ [ppm GPa <sup>-2</sup> ]	$\delta_1^{\text{N}^*}$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{N}^*}$ [ppm]
W7 H $\epsilon$ 1	-1,9 $\pm$ 0,9	3,40 $\pm$ 0,18	130,107 $\pm$ 0,008
W29 H $\epsilon$ 1	-2,4 $\pm$ 0,8	3,42 $\pm$ 0,17	130,694 $\pm$ 0,007
Q44 H $\epsilon^{22}$	-4,7 $\pm$ 1,6	7,87 $\pm$ 0,33	111,637 $\pm$ 0,014
Q44 H $\epsilon^{21}$	-6,1 $\pm$ 1,3	8,13 $\pm$ 0,28	111,632 $\pm$ 0,012
Q51 H $\epsilon^{22}$	-3,8 $\pm$ 1,5	7,48 $\pm$ 0,31	111,516 $\pm$ 0,013
Q51 H $\epsilon^{21}$	-3,8 $\pm$ 1,5	7,48 $\pm$ 0,31	111,516 $\pm$ 0,013
Q58 H $\epsilon^{22}$	-2,3 $\pm$ 0,8	6,53 $\pm$ 0,17	112,176 $\pm$ 0,007
Q58 H $\epsilon^{21}$	-4,7 $\pm$ 1,0	7,19 $\pm$ 0,20	112,135 $\pm$ 0,009

Tab.10.12. Quadratische Koeffizienten der druckabhängigen chemischen Verschiebung der Seitenketten-<sup>15</sup>N-Atome in *TmCsp*, im Druckbereich von Normaldruck bis 200 MPa (303 K Phosphatpuffer).

### 10.2.3. Temperaturabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen

Amino- säure	$\delta_2^{\text{HN}}$ [ppm K <sup>-2</sup> ]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm K <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_2^{\text{HN}}$	$\delta_1^{\text{HN}}$	$\delta_0^{\text{HN}}$
Max	4,3E-05	0,04	14	0,43	0,25	11
Min	-7,9E-05	-0,03	4	-0,79	-1,34	6
Mwt.	-3,1E-06	0,00	9	-0,03	-0,38	9
Stdabw.	1,7E-05	0,01	2	0,17	0,30	1
M1	2,1E-05 ± 1,6E-05	-1,6E-02 ± 9,3E-03	11,2 ± 1,4	0,21	-0,55	8,57
R2	-4,5E-06 ± 3,0E-06	-3,5E-03 ± 1,8E-03	10,1 ± 0,3	-0,05	-0,58	8,90
G3	3,0E-07 ± 3,0E-06	-3,5E-03 ± 1,8E-03	9,8 ± 0,3	0,00	-0,33	8,95
K4	1,9E-06 ± 2,0E-06	-4,9E-03 ± 1,2E-03	10,0 ± 0,2	0,02	-0,39	8,85
V5	7,6E-06 ± 4,0E-06	-9,0E-03 ± 2,4E-03	11,3 ± 0,4	0,08	-0,52	9,48
K6	2,7E-05 ± 1,2E-05	-2,1E-02 ± 7,5E-03	13,0 ± 1,1	0,27	-0,69	9,60
W7	-3,5E-06 ± 2,4E-06	-7,0E-04 ± 1,4E-03	8,1 ± 0,2	-0,03	-0,24	7,72
F8	-2,7E-06 ± 3,0E-06	-1,2E-03 ± 1,8E-03	9,7 ± 0,3	-0,03	-0,26	9,19
D9	1,5E-05 ± 1,0E-05	-1,3E-02 ± 6,5E-03	10,6 ± 1,0	0,15	-0,53	8,35
S10	-2,7E-05 ± 2,3E-05	1,1E-02 ± 1,3E-02	8,6 ± 1,9	-0,27	-0,29	9,52
K11	-8,9E-06 ± 2,4E-06	3,9E-03 ± 1,4E-03	7,9 ± 0,2	-0,09	-0,05	8,34
K12	9,7E-06 ± 2,5E-06	-8,7E-03 ± 1,5E-03	9,5 ± 0,2	0,10	-0,39	7,94
G13	-8,0E-06 ± 2,2E-06	6,3E-04 ± 1,3E-03	9,0 ± 0,2	-0,08	-0,34	8,62
Y14	-1,2E-05 ± 3,4E-06	7,2E-03 ± 2,1E-03	5,6 ± 0,3	-0,12	0,11	6,63
G15	-5,6E-06 ± 3,6E-06	3,2E-03 ± 2,1E-03	7,4 ± 0,3	-0,06	0,04	7,88
F16	1,7E-06 ± 5,6E-06	-4,2E-04 ± 3,5E-03	7,8 ± 0,5	0,02	0,04	7,80
I17	4,3E-05 ± 6,8E-06	-2,9E-02 ± 4,1E-03	14,4 ± 0,6	0,43	-0,82	9,68
T18	-5,3E-06 ± 3,2E-06	8,2E-04 ± 1,9E-03	9,6 ± 0,3	-0,05	-0,18	9,43
K19	-7,9E-05 ± 1,5E-05	4,2E-02 ± 8,7E-03	4,2 ± 1,3	-0,79	0,19	9,69
D20	-1,1E-05 ± 2,7E-06	1,1E-03 ± 1,6E-03	9,8 ± 0,2	-0,11	-0,42	9,41
E21	-3,3E-06 ± 6,0E-06	-3,4E-03 ± 3,5E-03	9,8 ± 0,5	-0,03	-0,51	8,77
G22	-5,2E-06 ± 4,0E-06	2,3E-03 ± 2,4E-03	7,5 ± 0,4	-0,05	-0,03	7,79
G23	-2,2E-05 ± 5,5E-06	7,4E-03 ± 3,2E-03	8,1 ± 0,5	-0,22	-0,37	8,60
D24	5,3E-08 ± 4,7E-06	-7,8E-03 ± 2,8E-03	10,9 ± 0,4	0,00	-0,78	8,92
V25	-2,4E-05 ± 5,0E-06	1,1E-02 ± 3,0E-03	8,7 ± 0,4	-0,24	-0,10	9,88
F26	-2,2E-06 ± 2,7E-06	-4,1E-03 ± 1,7E-03	10,0 ± 0,3	-0,02	-0,52	8,82
V27	-2,0E-07 ± 6,5E-06	-9,8E-04 ± 3,9E-03	8,0 ± 0,6	0,00	-0,11	7,75
H28	-3,2E-05 ± 7,3E-06	1,4E-02 ± 4,4E-03	7,5 ± 0,7	-0,32	-0,20	8,98
W29	-8,2E-06 ± 4,3E-06	1,8E-03 ± 2,6E-03	8,4 ± 0,4	-0,08	-0,23	8,37
S30	9,7E-06 ± 3,3E-06	-2,3E-03 ± 2,1E-03	6,8 ± 0,3	0,10	0,25	6,86
A31	-7,9E-06 ± 3,5E-06	3,3E-03 ± 2,1E-03	7,6 ± 0,3	-0,08	-0,06	7,96
I32	-2,2E-06 ± 5,4E-06	-6,6E-04 ± 3,3E-03	7,8 ± 0,5	-0,02	-0,18	7,45
E33	-1,1E-05 ± 3,0E-06	1,8E-03 ± 1,8E-03	9,8 ± 0,3	-0,11	-0,40	9,55
M34	-1,1E-05 ± 3,6E-06	2,6E-03 ± 2,1E-03	7,9 ± 0,3	-0,11	-0,31	7,81
E35	-1,3E-05 ± 3,9E-06	2,9E-03 ± 2,3E-03	9,0 ± 0,3	-0,13	-0,37	8,89
G36	3,0E-06 ± 3,2E-06	-8,1E-03 ± 1,8E-03	10,7 ± 0,3	0,03	-0,65	8,87
F37	-9,3E-06 ± 2,5E-06	-2,6E-03 ± 1,5E-03	9,8 ± 0,2	-0,09	-0,73	8,61
T39	5,6E-06 ± 6,3E-06	-8,4E-03 ± 3,8E-03	9,5 ± 0,6	0,06	-0,57	7,78
L40	1,7E-05 ± 4,4E-06	-1,4E-02 ± 2,7E-03	8,4 ± 0,4	0,17	-0,51	6,01
K41	-2,1E-05 ± 1,1E-05	8,9E-03 ± 6,5E-03	7,5 ± 1,0	-0,21	-0,17	8,36
E42	1,1E-05 ± 4,4E-06	-1,2E-02 ± 2,7E-03	11,5 ± 0,4	0,11	-0,69	9,08
G43	-1,7E-06 ± 3,5E-06	-2,7E-03 ± 2,2E-03	10,1 ± 0,3	-0,02	-0,35	9,30
Q44	-1,2E-05 ± 3,2E-06	5,0E-03 ± 2,0E-03	7,3 ± 0,3	-0,12	-0,09	7,82
V45	3,2E-06 ± 2,9E-06	-7,9E-03 ± 1,7E-03	11,0 ± 0,3	0,03	-0,63	9,24
V46	-1,1E-07 ± 8,0E-06	8,9E-04 ± 4,8E-03	8,1 ± 0,7	0,00	0,08	8,35
E47	-1,4E-05 ± 3,5E-06	1,3E-03 ± 2,1E-03	10,0 ± 0,3	-0,14	-0,57	9,50
F48	2,4E-06 ± 6,4E-06	-4,6E-03 ± 3,9E-03	9,7 ± 0,6	0,02	-0,34	8,69

E49	-8,1E-06 ± 5,0E-06	3,0E-03 ± 3,0E-03	8,7 ± 0,5	-0,08	-0,10	8,91
I50	-3,6E-07 ± 3,3E-06	-7,1E-03 ± 2,0E-03	11,1 ± 0,3	0,00	-0,72	9,28
Q51	2,0E-06 ± 2,1E-06	-5,5E-03 ± 1,2E-03	10,7 ± 0,2	0,02	-0,45	9,47
E52	-5,4E-06 ± 5,1E-06	-4,0E-03 ± 3,0E-03	10,6 ± 0,4	-0,05	-0,67	9,23
G53	2,1E-05 ± 5,4E-06	-1,9E-02 ± 3,2E-03	12,0 ± 0,5	0,21	-0,90	8,44
G56	-8,7E-06 ± 3,0E-06	3,6E-03 ± 1,8E-03	7,1 ± 0,3	-0,09	-0,08	7,47
Q58	-1,2E-05 ± 1,9E-06	3,7E-03 ± 1,2E-03	8,9 ± 0,2	-0,12	-0,21	9,15
A59	-3,7E-06 ± 2,3E-06	-2,1E-03 ± 1,4E-03	10,0 ± 0,2	-0,04	-0,40	9,24
A60	-2,6E-06 ± 2,6E-06	-2,2E-03 ± 1,6E-03	10,2 ± 0,2	-0,03	-0,35	9,48
H61	-4,0E-06 ± 2,3E-06	-4,6E-03 ± 1,4E-03	10,9 ± 0,2	-0,04	-0,66	9,54
V62	-1,3E-05 ± 4,3E-06	4,4E-03 ± 2,6E-03	8,3 ± 0,4	-0,13	-0,19	8,58
K63	1,6E-05 ± 1,0E-05	-1,4E-02 ± 6,0E-03	11,9 ± 0,9	0,16	-0,56	9,55
V64	-3,8E-06 ± 4,8E-06	-7,3E-03 ± 2,9E-03	11,1 ± 0,4	-0,04	-0,93	9,06
V65	-1,8E-05 ± 5,5E-06	7,0E-03 ± 3,3E-03	8,1 ± 0,5	-0,18	-0,19	8,78
E66	3,9E-05 ± 1,8E-06	-3,3E-02 ± 1,1E-03	14,4 ± 0,2	0,39	-1,34	8,62

Tab.10.13. Quadratische Koeffizienten der temperaturabhängigen chemischen Verschiebung der  $H^N$ -Atome in *TmCsp*, im Temperaturbereich von 255 K - 339 K und einem Druck von 200 MPa. Fehlende Werte sind aufgrund von Austauschverbreiterung nicht sichtbar.

Amino- säure	$\delta_2^{N^*}$ [ppm K <sup>-2</sup> ]	$\delta_1^{N^*}$ [ppm K <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{N^*}$ [ppm]	$\delta_2^{N^*}$	$\delta_1^{N^*}$	$\delta_0^{N^*}$
Max	2,1E-04	2,0E-01	159	2,07	5,02	137
Min	-3,1E-04	-1,6E-01	88	-3,06	-6,12	104
Mwt.	-1,7E-05	2,2E-03	122	-0,17	-0,62	122
Stdabw.	1,0E-04	6,5E-02	13	1,01	1,79	7
M1	-1,8E-04 ± 4,3E-05	1,1E-01 ± 2,5E-02	113 ± 4	-1,75	1,75	129
R2	-3,1E-04 ± 5,8E-05	2,0E-01 ± 3,5E-02	88 ± 5	-3,06	5,02	119
G3	-5,6E-05 ± 2,1E-05	2,9E-02 ± 1,3E-02	106 ± 2	-0,56	0,08	110
K4	-1,5E-05 ± 1,0E-05	-1,4E-02 ± 6,0E-03	127 ± 1	-0,15	-2,17	123
V5	4,7E-05 ± 2,0E-05	-3,8E-02 ± 1,2E-02	133 ± 2	0,47	-1,51	126
K6	-2,0E-04 ± 4,0E-05	1,1E-01 ± 2,4E-02	124 ± 4	-2,01	0,44	137
W7	8,7E-05 ± 1,0E-05	-5,6E-02 ± 6,2E-03	120 ± 1	0,87	-1,24	112
F8	1,6E-04 ± 2,2E-05	-1,1E-01 ± 1,3E-02	141 ± 2	1,64	-3,08	123
D9	1,4E-04 ± 5,3E-05	-9,9E-02 ± 3,3E-02	146 ± 5	1,44	-2,69	130
S10	9,9E-05 ± 7,6E-05	-5,2E-02 ± 4,4E-02	129 ± 6	0,99	-0,23	122
K11	-1,8E-04 ± 1,1E-05	1,1E-01 ± 6,8E-03	105 ± 1	-1,76	2,42	122
K12	-3,0E-05 ± 8,8E-06	1,0E-02 ± 5,3E-03	118 ± 1	-0,30	-0,48	119
G13	-6,7E-05 ± 1,6E-05	3,2E-02 ± 9,6E-03	104 ± 1	-0,67	-0,18	108
Y14	9,3E-06 ± 2,2E-05	-2,6E-03 ± 1,4E-02	113 ± 2	0,09	0,21	113
G15	-6,2E-05 ± 3,0E-05	4,2E-02 ± 1,8E-02	98 ± 3	-0,62	1,10	104
F16	2,0E-05 ± 2,7E-05	-1,0E-02 ± 1,6E-02	117 ± 3	0,20	-0,03	115
I17	1,4E-04 ± 2,5E-05	-8,7E-02 ± 1,5E-02	136 ± 2	1,42	-1,63	123
T18	-4,7E-05 ± 1,9E-05	2,1E-02 ± 1,1E-02	123 ± 2	-0,47	-0,25	125
K19	-2,2E-04 ± 5,8E-05	9,5E-02 ± 3,5E-02	123 ± 5	-2,18	-1,45	133
D20	-4,1E-05 ± 1,4E-05	-3,6E-04 ± 8,7E-03	132 ± 1	-0,41	-2,10	129
E21	-2,4E-05 ± 3,4E-05	1,7E-02 ± 2,0E-02	112 ± 3	-0,24	0,49	115
G22	-1,2E-04 ± 1,9E-05	5,7E-02 ± 1,1E-02	105 ± 2	-1,18	-0,17	112
G23	-4,8E-06 ± 2,7E-05	-1,5E-02 ± 1,6E-02	117 ± 2	-0,05	-1,71	113
D24	-4,1E-05 ± 2,9E-05	3,9E-02 ± 1,7E-02	112 ± 3	-0,41	1,91	119
V25	2,8E-06 ± 2,2E-05	-1,7E-02 ± 1,3E-02	125 ± 2	0,03	-1,56	121
F26	4,7E-05 ± 1,5E-05	-5,2E-02 ± 9,4E-03	143 ± 1	0,47	-2,81	133
V27	-4,5E-06 ± 1,6E-05	7,2E-03 ± 9,8E-03	123 ± 1	-0,04	0,49	124
H28	-9,2E-05 ± 9,8E-06	5,5E-02 ± 5,9E-03	120 ± 1	-0,92	0,85	128

W29	-9,2E-05 ± 1,7E-05	5,6E-02 ± 1,0E-02	116 ± 2	-0,92	0,99	124
S30	-8,7E-05 ± 2,8E-05	5,3E-02 ± 1,7E-02	109 ± 3	-0,87	0,93	117
A31	-3,8E-05 ± 1,4E-05	1,2E-02 ± 8,4E-03	125 ± 1	-0,38	-0,75	126
I32	-6,8E-05 ± 1,6E-05	4,4E-02 ± 1,0E-02	112 ± 2	-0,68	0,96	118
E33	-9,9E-05 ± 1,3E-05	6,2E-02 ± 7,9E-03	122 ± 1	-0,99	1,20	131
M34	-1,4E-04 ± 1,1E-05	7,0E-02 ± 6,4E-03	112 ± 1	-1,36	0,19	121
E35	-2,1E-04 ± 2,9E-05	1,4E-01 ± 1,7E-02	99 ± 2	-2,06	3,66	121
G36	-9,0E-05 ± 2,9E-05	5,2E-02 ± 1,7E-02	103 ± 2	-0,90	0,65	111
F37	-1,0E-04 ± 1,3E-05	4,8E-02 ± 7,5E-03	118 ± 1	-1,02	-0,33	123
T39	-1,2E-04 ± 8,4E-05	2,0E-02 ± 5,1E-02	122 ± 8	-1,20	-3,98	119
L40	1,2E-04 ± 2,2E-05	-8,6E-02 ± 1,4E-02	135 ± 2	1,25	-2,34	122
K41	8,1E-05 ± 4,6E-05	-4,2E-02 ± 2,8E-02	124 ± 4	0,81	-0,16	118
E42	-1,2E-06 ± 2,1E-05	-5,8E-03 ± 1,3E-02	124 ± 2	-0,01	-0,64	123
G43	-4,7E-05 ± 2,0E-05	1,2E-02 ± 1,2E-02	115 ± 2	-0,47	-1,19	115
Q44	7,2E-06 ± 9,7E-06	-7,0E-03 ± 5,9E-03	121 ± 1	0,07	-0,34	120
V45	2,2E-05 ± 1,0E-05	-2,6E-02 ± 6,2E-03	132 ± 1	0,22	-1,45	127
V46	2,6E-05 ± 2,0E-05	-1,4E-02 ± 1,2E-02	120 ± 2	0,26	-0,14	118
E47	1,4E-04 ± 2,4E-05	-8,1E-02 ± 1,5E-02	132 ± 2	1,39	-1,18	121
F48	6,1E-05 ± 1,8E-05	-4,9E-02 ± 1,1E-02	128 ± 2	0,61	-1,82	119
E49	-2,8E-05 ± 2,0E-05	2,9E-02 ± 1,2E-02	112 ± 2	-0,28	1,48	117
I50	9,3E-08 ± 8,3E-06	6,7E-05 ± 5,0E-03	121 ± 1	0,00	0,01	121
Q51	-5,8E-06 ± 1,3E-05	-1,3E-02 ± 7,7E-03	132 ± 1	-0,06	-1,61	128
E52	-3,0E-07 ± 3,3E-05	-1,9E-02 ± 1,9E-02	131 ± 3	0,00	-1,90	126
G53	-5,2E-05 ± 1,7E-05	1,1E-02 ± 1,0E-02	115 ± 2	-0,52	-1,55	114
G56	-8,5E-05 ± 1,4E-05	4,4E-02 ± 8,4E-03	104 ± 1	-0,85	0,14	109
Q58	9,7E-05 ± 1,2E-05	-6,4E-02 ± 7,5E-03	131 ± 1	0,97	-1,59	121
A59	6,6E-05 ± 2,1E-05	-4,2E-02 ± 1,2E-02	130 ± 2	0,66	-0,83	124
A60	1,8E-05 ± 2,0E-05	-2,0E-02 ± 1,2E-02	128 ± 2	0,18	-1,12	124
H61	3,4E-05 ± 2,2E-05	-3,2E-02 ± 1,3E-02	125 ± 2	0,34	-1,47	119
V62	-8,9E-06 ± 1,3E-05	3,4E-03 ± 7,7E-03	118 ± 1	-0,09	-0,11	118
K63	6,2E-05 ± 2,7E-05	-4,8E-02 ± 1,6E-02	137 ± 2	0,62	-1,73	128
V64	-4,9E-06 ± 1,6E-05	-9,4E-03 ± 9,7E-03	127 ± 1	-0,05	-1,18	125
V65	2,1E-04 ± 3,7E-05	-1,6E-01 ± 2,3E-02	159 ± 3	2,07	-6,12	131
E66	2,0E-04 ± 1,3E-05	-1,5E-01 ± 7,8E-03	156 ± 1	1,97	-5,21	131

Tab.10.14. Quadratische Koeffizienten der temperaturabhängigen chemischen Verschiebung der  $^{15}\text{N}^{\text{c}}$ -Atome in *TmCsp*, im Temperaturbereich von 255 K - 339 K und einem Druck von 200 MPa. Fehlende Werte sind aufgrund von Austauschverbreiterung nicht sichtbar.

Amino-säure	$\delta_2^{\text{C}^{\text{c}}}$ [ppm K <sup>-2</sup> ]	$\delta_1^{\text{C}^{\text{c}}}$ [ppm K <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{C}^{\text{c}}}$ [ppm]	$\delta_2^{\text{C}^{\text{c}}}$	$\delta_1^{\text{C}^{\text{c}}}$	$\delta_0^{\text{C}^{\text{c}}}$
Max	2,3E-04	2,2E-01	201	3,25	6,16	179
Min	-3,5E-04	-1,8E-01	136	-3,51	-2,17	0
Mwt.	-1,4E-05	6,7E-03	174	-0,08	0,23	159
Stdabw.	1,1E-04	7,1E-02	11	1,14	1,24	50
R2	-1,7E-04 ± 4,6E-05	9,9E-02 ± 2,7E-02	156 ± 4	-1,73	1,30	170
G3	6,4E-05 ± 7,1E-05	-5,0E-02 ± 4,3E-02	186 ± 7	0,64	-1,77	177
K4	2,3E-05 ± 2,7E-05	-1,9E-02 ± 1,6E-02	175 ± 2	0,23	-0,76	172
V5	-7,3E-05 ± 2,1E-05	4,8E-02 ± 1,3E-02	168 ± 2	-0,73	1,19	176
K6	-1,8E-05 ± 6,0E-06	1,1E-02 ± 3,6E-03	174 ± 1	-0,18	0,19	176
F8	1,2E-04 ± 1,9E-04	-5,8E-02 ± 1,1E-01	180 ± 16	1,16	-0,03	173
D9	-1,7E-05 ± 1,4E-05	1,3E-02 ± 8,5E-03	170 ± 1	-0,17	0,39	172
K11	2,0E-04 ± 5,4E-05	-1,2E-01 ± 3,2E-02	193 ± 5	2,00	-1,80	176
K12	8,2E-05 ± 4,7E-05	-5,8E-02 ± 2,9E-02	189 ± 4	0,82	-1,67	179

G13	-1,6E-04 ± 6,3E-05	9,6E-02 ± 3,7E-02	163 ± 5	-1,58	1,66	177
Y14	-1,9E-05 ± 3,1E-05	1,1E-02 ± 1,8E-02	171 ± 3	-0,19	0,21	172
G15	1,7E-05 ± 3,1E-05	-3,9E-03 ± 1,8E-02	171 ± 3	0,17	0,45	171
F16	3,2E-05 ± 4,1E-05	-2,1E-02 ± 2,5E-02	174 ± 4	0,32	-0,44	171
I17	5,9E-05 ± 2,9E-05	-3,7E-02 ± 1,7E-02	180 ± 3	0,59	-0,71	175
T18	-7,6E-05 ± 6,0E-05	4,7E-02 ± 3,7E-02	167 ± 6	-0,76	0,93	174
K19	2,3E-04 ± 1,8E-05	-1,4E-01 ± 1,1E-02	196 ± 2	2,31	-2,17	176
D20	1,8E-05 ± 8,9E-05	-8,2E-03 ± 5,1E-02	179 ± 7	0,18	0,09	178
E21	-2,6E-05 ± 2,5E-05	1,2E-02 ± 1,5E-02	177 ± 2	-0,26	-0,12	178
G22	1,1E-04 ± 2,8E-05	-5,6E-02 ± 1,6E-02	183 ± 2	1,07	-0,28	176
G23	-2,0E-04 ± 5,9E-05	1,1E-01 ± 3,3E-02	158 ± 5	-1,99	1,13	174
D24	2,1E-06 ± 9,2E-05	4,8E-03 ± 5,2E-02	171 ± 7	0,02	0,59	172
V25	-6,3E-05 ± 4,2E-05	4,0E-02 ± 2,6E-02	171 ± 4	-0,63	0,82	177
F26	-3,1E-04 ± 2,7E-04	2,2E-01 ± 1,7E-01	136 ± 26	-3,11	6,16	171
V27	2,6E-05 ± 1,3E-05	-9,9E-03 ± 7,8E-03	173 ± 1	0,26	0,31	172
H28	-3,5E-04 ± 5,5E-05	2,1E-01 ± 3,4E-02	140 ± 5	-3,51	3,09	169
W29	-2,7E-05 ± 2,0E-05	1,4E-02 ± 1,2E-02	175 ± 2	-0,27	0,07	177
S30	6,7E-05 ± 3,2E-05	-4,6E-02 ± 2,0E-02	185 ± 3	0,67	-1,24	177
A31	2,4E-05 ± 1,5E-05	-1,9E-02 ± 9,3E-03	179 ± 1	0,24	-0,70	175
I32	-7,0E-07 ± 2,8E-05	4,0E-03 ± 1,7E-02	176 ± 2	-0,01	0,37	176
M34	8,8E-06 ± 6,6E-05	1,8E-03 ± 3,8E-02	174 ± 5	0,09	0,62	175
E35	1,6E-04 ± 1,1E-04	-7,6E-02 ± 6,1E-02	182 ± 9	1,64	0,60	174
G36	1,2E-04 ± 0,0E+00	-7,2E-02 ± 0,0E+00	187 ± 0	1,25	-0,94	177
F37	-1,8E-05 ± 4,9E-05	1,5E-02 ± 2,8E-02	171 ± 4	-0,18	0,56	174
K38	2,8E-05 ± 4,2E-05	-1,4E-02 ± 2,6E-02	177 ± 4	0,28	0,03	175
L40	-8,5E-05 ± 4,4E-05	6,8E-02 ± 2,7E-02	158 ± 4	-0,85	2,53	170
K41	2,5E-05 ± 2,6E-05	-9,6E-03 ± 1,5E-02	175 ± 2	0,25	0,29	174
E42	-1,5E-04 ± 1,1E-04	9,3E-02 ± 6,2E-02	161 ± 9	-1,51	1,73	175
G43	9,8E-05 ± 5,4E-05	-6,6E-02 ± 3,3E-02	188 ± 5	0,98	-1,68	178
Q44	-1,5E-05 ± 1,8E-05	7,7E-03 ± 1,1E-02	174 ± 2	-0,15	0,04	175
V45	1,5E-05 ± 4,5E-05	-1,1E-02 ± 2,7E-02	178 ± 4	0,15	-0,40	176
V46	-1,0E-04 ± 1,2E-05	6,0E-02 ± 7,0E-03	167 ± 1	-1,03	0,83	176
E47	-6,2E-05 ± 7,6E-06	4,3E-02 ± 4,6E-03	167 ± 1	-0,62	1,21	174
F48	1,2E-05 ± 1,3E-05	-2,6E-03 ± 8,0E-03	175 ± 1	0,12	0,32	175
E49	3,1E-06 ± 1,4E-05	2,1E-03 ± 8,6E-03	171 ± 1	0,03	0,37	172
I50	9,9E-06 ± 1,2E-05	-1,7E-03 ± 6,9E-03	175 ± 1	0,10	0,33	175
Q51	3,1E-05 ± 5,4E-05	-1,1E-02 ± 3,3E-02	176 ± 5	0,31	0,44	175
E52	-9,0E-05 ± 8,9E-05	5,2E-02 ± 5,1E-02	167 ± 7	-0,90	0,71	175
G53	1,2E-04 ± 4,0E-05	-7,1E-02 ± 2,4E-02	187 ± 3	1,25	-0,90	177
K54	-3,0E-04 ± 1,9E-04	1,8E-01 ± 1,1E-01	148 ± 16	-3,05	2,93	174
G56	-8,8E-05 ± 3,8E-05	5,2E-02 ± 2,1E-02	168 ± 3	-0,88	0,80	176
Q58	-1,4E-05 ± 1,0E-05	6,9E-03 ± 6,1E-03	176 ± 1	-0,14	0,00	177
A59	2,8E-05 ± 1,0E-05	-1,4E-02 ± 6,2E-03	175 ± 1	0,28	0,03	173
A60	-5,8E-06 ± 1,9E-05	2,4E-03 ± 1,1E-02	176 ± 2	-0,06	-0,05	176
H61	4,1E-05 ± 2,0E-05	-1,9E-02 ± 1,2E-02	177 ± 2	0,41	0,20	175
V62	8,1E-05 ± 3,4E-05	-4,1E-02 ± 2,1E-02	179 ± 3	0,81	-0,09	173
K63	-5,8E-06 ± 1,3E-05	-1,7E-03 ± 7,9E-03	177 ± 1	-0,06	-0,46	176
V64	-2,0E-04 ± 9,9E-05	1,0E-01 ± 5,6E-02	162 ± 8	-1,97	0,66	176
V65	-6,8E-05 ± 3,7E-05	3,4E-02 ± 2,2E-02	173 ± 3	-0,68	0,04	177
E66	2,4E-05 ± 1,1E-05	-1,6E-02 ± 6,8E-03	178 ± 1	0,24	-0,42	175

Tab.10.15. Quadratische Koeffizienten der temperaturabhängigen chemischen Verschiebung der  $^{13}\text{C}$ -Atome in *TmCsp*, im Temperaturbereich von 255 K - 333 K und einem Druck von 200 MPa.



Amino-säure	$\delta_2^{\text{HN}}$ [ppm K <sup>-2</sup> ]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm K <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_2^{*\text{HN}}$	$\delta_1^{*\text{HN}}$	$\delta_0^{*\text{HN}}$
W7 H $\epsilon$ 1	-1,8E-07 $\pm$ 4,1E-06	-5,8E-03 $\pm$ 2,5E-03	12,2 $\pm$ 0,4	0,00	-0,59	10,73
W29 H $\epsilon$ 1	-1,5E-05 $\pm$ 4,2E-06	5,0E-03 $\pm$ 2,5E-03	10,2 $\pm$ 0,4	-0,15	-0,25	10,53
Q44 H $\epsilon$ 22	1,2E-05 $\pm$ 2,7E-06	-1,3E-02 $\pm$ 1,6E-03	9,7 $\pm$ 0,2	0,12	-0,71	7,18
Q44 H $\epsilon$ 21	-3,4E-06 $\pm$ 2,8E-06	-4,0E-03 $\pm$ 1,6E-03	9,0 $\pm$ 0,2	-0,03	-0,57	7,77
Q51 H $\epsilon$ 22	1,3E-05 $\pm$ 3,4E-06	-1,4E-02 $\pm$ 2,0E-03	9,9 $\pm$ 0,3	0,13	-0,73	7,27
Q51 H $\epsilon$ 21	1,0E-05 $\pm$ 2,9E-06	-1,2E-02 $\pm$ 1,7E-03	10,3 $\pm$ 0,2	0,10	-0,71	7,86
Q58 H $\epsilon$ 22	1,3E-05 $\pm$ 2,4E-06	-1,4E-02 $\pm$ 1,5E-03	9,9 $\pm$ 0,2	0,13	-0,76	7,14
Q58 H $\epsilon$ 21	2,7E-06 $\pm$ 2,0E-06	-7,2E-03 $\pm$ 1,2E-03	9,7 $\pm$ 0,2	0,03	-0,59	8,03

Tab.10.16. Quadratische Koeffizienten der temperaturabhängigen chemischen Verschiebung der H<sup>N</sup>-Atome in *TmCsp*, im Temperaturbereich von 255 K - 339 K und einem Druck von 200 MPa.

Amino-säure	$\delta_2^{\text{N}'}$ [ppm K <sup>-2</sup> ]	$\delta_1^{\text{N}'}$ [ppm K <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{N}'}$ [ppm]	$\delta_2^{*\text{N}'}$	$\delta_1^{*\text{N}'}$	$\delta_0^{*\text{N}'}$
W7 H $\epsilon$ 1	-5,7E-05 $\pm$ 1,2E-05	2,0E-02 $\pm$ 7,2E-03	130 $\pm$ 1	-0,57	-0,88	131
W29 H $\epsilon$ 1	2,9E-05 $\pm$ 2,7E-05	-2,9E-02 $\pm$ 1,6E-02	137 $\pm$ 2	0,29	-1,45	132
Q44 H $\epsilon$ 22	9,4E-05 $\pm$ 3,3E-05	-8,7E-02 $\pm$ 1,9E-02	131 $\pm$ 3	0,94	-3,98	115
Q44 H $\epsilon$ 21	-6,3E-06 $\pm$ 1,9E-05	-2,6E-02 $\pm$ 1,1E-02	121 $\pm$ 2	-0,06	-2,89	115
Q51 H $\epsilon$ 22	1,4E-04 $\pm$ 2,3E-05	-1,1E-01 $\pm$ 1,3E-02	134 $\pm$ 2	1,41	-4,13	115
Q51 H $\epsilon$ 21	9,9E-05 $\pm$ 3,2E-05	-8,8E-02 $\pm$ 1,9E-02	131 $\pm$ 3	0,99	-3,89	115
Q58 H $\epsilon$ 22	3,4E-05 $\pm$ 2,9E-05	-4,5E-02 $\pm$ 1,7E-02	124 $\pm$ 3	0,34	-2,81	115
Q58 H $\epsilon$ 21	-1,7E-04 $\pm$ 4,2E-05	8,3E-02 $\pm$ 2,5E-02	104 $\pm$ 4	-1,74	-0,36	114

Tab.10.17. Quadratische Koeffizienten der temperaturabhängigen chemischen Verschiebung der <sup>15</sup>N'-Atome in *TmCsp*, im Temperaturbereich von 255 K - 339 K und einem Druck von 200 MPa.

Amino-säure	$\delta_2^{\text{HN}}$ [ppm K <sup>-2</sup> ]	$\delta_1^{\text{HN}}$ [ppm K <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{\text{HN}}$ [ppm]	$\delta_2^{*\text{HN}}$	$\delta_1^{*\text{HN}}$	$\delta_0^{*\text{HN}}$
neu 1	3,2E-04 7,6E-05	-1,8E-01 4,1E-02	33,7 5,6	3,20	-1,88	8,95
neu 2	-6,8E-06 4,1E-05	-4,3E-03 2,2E-02	10,4 3,0	-0,07	-0,77	8,90
neu 3	1,4E-04 0,0E+00	-7,9E-02 0,0E+00	19,8 0,0	1,38	-1,00	8,67
neu 4	1,4E-04 5,6E-05	-8,7E-02 3,0E-02	21,4 3,9	1,44	-1,49	8,69
neu 5	1,5E-04 5,7E-05	-8,7E-02 3,0E-02	21,5 4,0	1,47	-1,39	8,86
neu 6	8,0E-05 0,0E+00	-5,9E-02 0,0E+00	18,6 0,0	0,80	-1,85	9,00
neu 7	3,3E-05 6,2E-06	-2,8E-02 3,4E-03	13,6 0,5	0,33	-1,14	8,67

Tab.10.18. Quadratische Koeffizienten der temperaturabhängigen chemischen Verschiebung der durch Tieftemperaturdenaturierung neu entstandenen Signale von H<sup>N</sup>-Atomen in *TmCsp*, im Temperaturbereich von 255 K - 339 K und einem Druck von 200 MPa.

Amino-säure	$\delta_2^{C'}$ [ppm K <sup>-2</sup> ]	$\delta_1^{C'}$ [ppm K <sup>-1</sup> ]	$\delta_0^{C'}$ [ppm]	$\delta_2^{*C'}$	$\delta_1^{*C'}$	$\delta_0^{*C'}$
neu 1	3,2E-04 ± 1,1E-04	-1,8E-01 ± 5,9E-02	201 ± 8	3,25	-1,69	177
neu 2	3,3E-07 ± 2,1E-06	-3,5E-03 ± 1,1E-03	177 ± 0	0,00	-0,33	176
neu 3	6,4E-04 ± 0,0E+00	-3,4E-01 ± 0,0E+00	223 ± 0	6,40	-2,30	177
neu 4	3,2E-04 ± 1,6E-04	-1,6E-01 ± 8,6E-02	195 ± 11	3,20	-0,23	175
neu 5	-2,0E-08 ± 8,9E-06	-3,3E-03 ± 4,7E-03	177 ± 1	0,00	-0,33	176
neu 6	3,3E-04 ± 0,0E+00	-1,8E-01 ± 0,0E+00	201 ± 0	3,30	-1,05	178
neu 7	-1,1E-05 ± 2,7E-05	5,0E-05 ± 1,5E-02	176 ± 2	-0,11	-0,55	175

Tab.10.19. Quadratische Koeffizienten der temperaturabhängigen chemischen Verschiebung der durch Tieftemperaturdenaturierung neu entstandenen Signale von <sup>13</sup>C'- Atomen in *TmCsp*, im Temperaturbereich von 255 K - 333 K und einem Druck von 200 MPa.

Amino-säure	S	E <sub>OH</sub> [kJ mol <sup>-1</sup> ]	R <sub>B</sub> [s <sup>-1</sup> ]	R <sub>K</sub>	$\delta_2(p)$ [ppm GPa <sup>-2</sup> ]	$\delta_1(p)$ [ppm GPa <sup>-1</sup> ]	$\delta_0(p)$ [ppm]	$\delta_i(T)$ [ppb K <sup>-1</sup> ]
M1	0		0,00	4	-0,340	0,450	8,426	7,97
R2	1	-0,2	88,63	10	-0,060	0,350	8,376	7,64
G3	1	-12,2	4,25	0	0,050	0,120	8,403	7,02
K4	1	-2,5	1,87	0	-0,250	0,360	8,403	7,87
V5	1	-14,6	0,36	0	-0,450	0,610	8,189	8,35
K6	1	-9,6	0,91	0	-0,250	0,360	8,403	7,87
W7	1	-10,0	0,71	0	-0,570	0,570	8,178	7,98
F8	1	-7,2	0,62	4	0,100	0,470	8,301	8,12
D9	1	-19,9	0,86	4	0,180	0,290	8,419	6,43
S10	0	-0,1	2,23	10	-0,340	0,480	8,352	7,02
K11	0	0,0	2,51	10	-0,250	0,360	8,403	7,87
K12	0	-4,5	1,66	10	-0,250	0,360	8,403	7,87
G13	1	-3,5	3,37	4	0,050	0,120	8,403	7,02
Y14	1	-10,9	1,10	0	-0,200	0,380	8,193	9,32
G15	1	-12,2	2,87	0	0,050	0,120	8,403	7,02
F16	1	-13,5	1,19	0	0,100	0,470	8,301	8,12
I17	1	-2,9	0,30	0	-0,660	0,630	8,200	8,35
T18	1	-17,4	0,70	0	-0,440	0,720	8,249	7,40
K19	1	-4,5	2,00	4	-0,250	0,360	8,403	7,87
D20	0	-9,3	0,98	10	0,180	0,290	8,419	6,43
E21	0	-0,5	0,32	10	0,530	-0,130	8,521	7,01
G22	0	-12,3	1,91	10	0,050	0,120	8,403	7,02
G23	0	-0,4	3,79	10	0,050	0,120	8,403	7,02
D24	1	0,0	1,10	10	0,180	0,290	8,419	6,43
V25	1	-19,7	0,19	0	-0,450	0,610	8,189	8,35
F26	1	-4,9	0,58	4	0,100	0,470	8,301	8,12
V27	1	-11,6	0,32	0	-0,450	0,610	8,189	8,35
H28	1	-2,5	4,83	4	-0,510	0,600	8,364	7,49
W29	1	-1,3	2,86	4	-0,570	0,570	8,178	7,98
S30	0	-1,1	2,52	10	-0,340	0,480	8,352	7,02
A31	0	-2,3	2,76	10	-0,440	0,630	8,281	8,20
I32	0	-1,8	0,26	4	-0,660	0,630	8,200	8,35
E33	0	-0,8	0,28	10	0,530	-0,130	8,521	7,01
M34	0	-0,8	1,01	10	-0,340	0,450	8,426	7,97
E35	0	-0,1	0,61	10	0,530	-0,130	8,521	7,01
G36	0	-0,4	1,91	10	0,050	0,120	8,403	7,02
F37	0	-0,2	1,19	10	0,100	0,470	8,301	8,12

K38	0	-0,6	1,46	10	-0,250	0,360	8,403	7,87
T39	0	-0,3	1,57	10	-0,440	0,720	8,249	7,40
L40	0	-0,9	0,58	10	-0,470	0,530	8,317	8,42
K41	0	-0,6	0,78	4	-0,250	0,360	8,403	7,87
E42	0	-0,3	0,62	10	0,530	-0,130	8,521	7,01
G43	1	-0,3	1,91	10	0,050	0,120	8,403	7,02
Q44	1	-3,9	2,35	0	0,050	0,330	8,440	7,65
V45	1	-7,8	0,44	4	-0,450	0,610	8,189	8,35
V46	1	-1,3	0,20	0	-0,450	0,610	8,189	8,35
E47	1	-5,3	0,34	0	0,530	-0,130	8,521	7,01
F48	1	-0,3	0,60	0	0,100	0,470	8,301	8,12
E49	1	-8,0	0,55	0	0,530	-0,130	8,521	7,01
I50	1	-0,2	0,19	10	-0,660	0,630	8,200	8,35
Q51	1	-9,4	0,94	4	0,050	0,330	8,440	7,65
E52	0	-12,4	0,75	10	0,530	-0,130	8,521	7,01
G53	0	-4,3	1,91	10	0,050	0,120	8,403	7,02
K54	0	-0,1	1,87	10	-0,250	0,360	8,403	7,87
K55	0	-0,3	1,66	10	-0,250	0,360	8,403	7,87
G56	0	-0,2	3,37	10	0,050	0,120	8,403	7,02
P57	0			10				
Q58	1	-10,7	0,91	4	0,050	0,330	8,440	7,65
A59	1	-11,9	2,19	4	-0,440	0,630	8,281	8,20
A60	1	-7,1	1,38	4	-0,440	0,630	8,281	8,20
H61	1	-2,2	6,67	4	-0,510	0,600	8,364	7,49
V62	1	-14,9	1,46	4	-0,450	0,610	8,189	8,35
K63	1	-11,8	0,91	4	-0,250	0,360	8,403	7,87
V64	1	-0,3	0,36	4	-0,450	0,610	8,189	8,35
V65	1	-10,9	0,20	4	-0,450	0,610	8,189	8,35
E66	0	-0,6	0,34	10	0,530	-0,130	8,521	7,01

Tab.10.20. Tabelle der zur Korrelation verwendeten Datensätze. Alle Daten sind in der Sequenz von *TmCsp* zusammengestellt.

**S**: Sekundärstruktur  $\beta$ -Strang = 1, Schleife = 0. **E<sub>OH</sub>**: Energie der Wasserstoffbrücken, berechnet mit AURELIA aus der Struktur von *TmCsp* (Kremer et al. 2001) bei 300 K, 0,1 MPa. **R<sub>B</sub>**: Austauschraten berechnet nach dem Verfahren von Bai und Englander (1993) mit 303 K und pH 6,5. **R<sub>K</sub>**: Austauschraten nach qualitative Angaben von Kremer et al. (2001) 10 stark, 4 moderat, 0 geringer Austausch.  **$\delta_2(\mathbf{p})$ ,  $\delta_1(\mathbf{p})$ ,  $\delta_0(\mathbf{p})$** : konstante lineare und quadratische Druckkoeffizienten des Tetrapeptidmodells GGXA für ungefaltete Proteine. (Kapitel 4).  **$\delta_1(\mathbf{T})$** : Lineare Temperaturkoeffizienten des Tetrapeptidmodells GGXGG für ungefaltete Proteine (Merutka et al. 1994).

### 10.2.4. Druck- und Temperaturabhängigkeit der Signalvolumina

	$V_1$ [GPa <sup>-1</sup> ]	$V_0$
<b>Max.</b>	1,3	1,67
<b>Min.</b>	-1,7	-1,23
<b>Mwt.</b>	0,0	0,04
<b>Stdabw.</b>	0,7	0,66
form. M1	$-0,2 \pm 0,4$	$0,30 \pm 0,07$
R2	$0,6 \pm 0,2$	$-0,55 \pm 0,05$
G3	$-0,4 \pm 0,4$	$0,47 \pm 0,07$
K4	$-1,0 \pm 0,3$	$1,09 \pm 0,06$
V5	$-0,9 \pm 0,3$	$0,96 \pm 0,06$
K6	$0,7 \pm 0,3$	$-0,61 \pm 0,06$
W7	$-0,9 \pm 0,1$	$0,90 \pm 0,02$
F8	$-0,6 \pm 0,3$	$0,58 \pm 0,05$
D9	$-0,6 \pm 0,3$	$0,71 \pm 0,06$
S10	$0,3 \pm 0,2$	$-0,19 \pm 0,05$
K11	$0,7 \pm 0,3$	$-0,71 \pm 0,06$
K12	$-0,3 \pm 0,4$	$0,36 \pm 0,07$
G13	$0,2 \pm 0,4$	$-0,08 \pm 0,07$
Y14	$-0,4 \pm 0,2$	$0,42 \pm 0,04$
G15	$0,0 \pm 0,4$	$0,10 \pm 0,07$
F16	$0,1 \pm 0,4$	$-0,02 \pm 0,07$
I17	$-0,9 \pm 0,3$	$0,92 \pm 0,06$
T18	$-0,5 \pm 0,3$	$0,62 \pm 0,06$
K19	$-0,9 \pm 0,2$	$0,84 \pm 0,04$
D20	$-0,4 \pm 0,4$	$0,51 \pm 0,07$
E21	$0,2 \pm 0,4$	$-0,07 \pm 0,07$
G22	$0,6 \pm 0,2$	$-0,64 \pm 0,04$
G23	$1,0 \pm 0,2$	$-1,00 \pm 0,03$
D24	$0,2 \pm 0,4$	$-0,16 \pm 0,07$
V25	$0,3 \pm 0,4$	$-0,17 \pm 0,07$
F26	$-1,7 \pm 0,3$	$1,67 \pm 0,05$
V27	$0,5 \pm 0,4$	$-0,39 \pm 0,07$
H28	$-1,5 \pm 0,3$	$1,59 \pm 0,06$
W29	$0,5 \pm 0,3$	$-0,44 \pm 0,06$
S30	$0,0 \pm 0,4$	$0,07 \pm 0,07$
A31	$0,1 \pm 0,4$	$-0,01 \pm 0,07$
I32	$0,5 \pm 0,4$	$-0,41 \pm 0,07$
E33	$0,0 \pm 0,4$	$0,13 \pm 0,07$
M34	$0,1 \pm 0,4$	$-0,02 \pm 0,07$
E35	$0,5 \pm 0,3$	$-0,37 \pm 0,05$
G36	$0,3 \pm 0,3$	$-0,21 \pm 0,06$
F37	$0,5 \pm 0,3$	$-0,40 \pm 0,06$
K38	$0,3 \pm 0,2$	$-0,34 \pm 0,03$
T39	$-0,9 \pm 0,3$	$0,94 \pm 0,05$
L40	$-0,4 \pm 0,3$	$0,46 \pm 0,07$
K41	$0,4 \pm 0,3$	$-0,37 \pm 0,06$
E42	$0,8 \pm 0,3$	$-0,76 \pm 0,06$
G43	$1,0 \pm 0,2$	$-1,04 \pm 0,04$
Q44	$0,7 \pm 0,4$	$-0,63 \pm 0,07$
V45	$0,2 \pm 0,4$	$-0,07 \pm 0,07$
V46	$0,0 \pm 0,4$	$0,11 \pm 0,07$
E47	$0,2 \pm 0,4$	$-0,13 \pm 0,07$
F48	$0,1 \pm 0,4$	$-0,01 \pm 0,07$

E49	$0,2 \pm 0,4$	$-0,14 \pm 0,07$
I50	$0,8 \pm 0,3$	$-0,72 \pm 0,06$
E52	$0,4 \pm 0,2$	$-0,38 \pm 0,03$
G53	$1,3 \pm 0,3$	$-1,23 \pm 0,05$
K55	$0,3 \pm 0,2$	$-0,24 \pm 0,03$
G56	$0,8 \pm 0,3$	$-0,78 \pm 0,05$
Q58	$0,0 \pm 0,4$	$0,13 \pm 0,07$
A59	$0,8 \pm 0,3$	$-0,75 \pm 0,06$
A60	$-0,2 \pm 0,4$	$0,27 \pm 0,07$
H61	$0,5 \pm 0,3$	$-0,36 \pm 0,07$
V62	$0,0 \pm 0,4$	$0,05 \pm 0,07$
K63	$-0,4 \pm 0,1$	$0,38 \pm 0,03$
V64	$0,4 \pm 0,3$	$-0,34 \pm 0,06$
V65	$-1,2 \pm 0,2$	$1,18 \pm 0,04$
E66	$-1,6 \pm 0,3$	$1,66 \pm 0,05$

Tab.10.21. Lineare und konstante Koeffizienten der Regressionsgeraden der Signalvolumina der Amidprotonen bei Druckvariation von Normaldruck bis 200 MPa.

	$V_1$ [GPa <sup>-1</sup> ]	$V_0$
W7 H $\epsilon$ 1	$0,2 \pm 0,4$	$-0,12 \pm 0,07$
W29 H $\epsilon$ 1	$-0,5 \pm 0,3$	$0,59 \pm 0,07$
Q44 H $\epsilon^{22}$	$1,5 \pm 0,3$	$-1,46 \pm 0,05$
Q44 H $\epsilon^{21}$	$1,3 \pm 0,2$	$-1,27 \pm 0,04$
Q51 H $\epsilon^{22}$	$0,8 \pm 0,2$	$-0,78 \pm 0,04$
Q51 H $\epsilon^{21}$	$0,7 \pm 0,1$	$-0,69 \pm 0,01$
Q58 H $\epsilon^{22}$	$-0,8 \pm 0,2$	$0,74 \pm 0,04$
Q58 H $\epsilon^{21}$	$1,0 \pm 0,3$	$-0,92 \pm 0,06$

Tab.10.22. Lineare und konstante Koeffizienten der Regressionsgeraden der Signalvolumina der stickstoffgebundenen Seitenkettenprotonen von *TmCsp* bei Druckvariation von Normaldruck bis 200 MPa.

Aminosäure	$\Delta V_2$ [K <sup>-2</sup> ]	$\Delta V_1$ [K <sup>-1</sup> ]	$\Delta V_0$	$T_{\max}$ [K]
M1	$-0,0008 \pm 0,0003$	$0,5 \pm 0,2$	$-70 \pm 27$	299
R2	$-0,0008 \pm 0,0002$	$0,5 \pm 0,1$	$-69 \pm 16$	301
G3	$-0,0005 \pm 0,0001$	$0,3 \pm 0,1$	$-44 \pm 11$	317
K4	$-0,0007 \pm 0,0002$	$0,4 \pm 0,1$	$-62 \pm 20$	309
V5	$-0,0008 \pm 0,0002$	$0,5 \pm 0,1$	$-72 \pm 15$	313
K6	$-0,0005 \pm 0,0001$	$0,3 \pm 0,1$	$-54 \pm 11$	323
W7	$-0,0005 \pm 0,0001$	$0,3 \pm 0,1$	$-45 \pm 13$	322
F8	$-0,0006 \pm 0,0002$	$0,4 \pm 0,1$	$-55 \pm 14$	309
D9	$-0,0015 \pm 0,0005$	$1,0 \pm 0,3$	$-161 \pm 45$	324
S10	$-0,0002 \pm 0,0005$	$0,1 \pm 0,3$	$-21 \pm 46$	302
K11	$-0,0010 \pm 0,0002$	$0,6 \pm 0,1$	$-84 \pm 16$	299
K12	$-0,0008 \pm 0,0002$	$0,5 \pm 0,1$	$-72 \pm 14$	311
G13	$-0,0004 \pm 0,0001$	$0,3 \pm 0,1$	$-41 \pm 9$	316
Y14	$-0,0006 \pm 0,0004$	$0,4 \pm 0,2$	$-58 \pm 36$	309
G15	$-0,0003 \pm 0,0001$	$0,2 \pm 0,1$	$-30 \pm 8$	335
F16	$-0,0004 \pm 0,0002$	$0,2 \pm 0,1$	$-40 \pm 15$	341
I17	$-0,0007 \pm 0,0001$	$0,5 \pm 0,1$	$-70 \pm 13$	314
T18	$-0,0005 \pm 0,0002$	$0,3 \pm 0,1$	$-49 \pm 16$	308

K19	$-0,0003 \pm 0,0001$	$0,2 \pm 0,1$	$-34 \pm 10$	321
D20	$-0,0006 \pm 0,0002$	$0,4 \pm 0,1$	$-56 \pm 16$	305
E21	$-0,0013 \pm 0,0001$	$0,7 \pm 0,1$	$-107 \pm 12$	289
G22	$-0,0010 \pm 0,0002$	$0,6 \pm 0,1$	$-84 \pm 20$	297
G23	$-0,0014 \pm 0,0002$	$0,8 \pm 0,1$	$-121 \pm 20$	295
D24	$-0,0007 \pm 0,0001$	$0,4 \pm 0,1$	$-66 \pm 11$	301
V25	$-0,0005 \pm 0,0002$	$0,3 \pm 0,1$	$-52 \pm 15$	318
F26	$-0,0004 \pm 0,0003$	$0,2 \pm 0,2$	$-38 \pm 24$	328
V27	$-0,0006 \pm 0,0002$	$0,4 \pm 0,1$	$-57 \pm 16$	320
H28	$-0,0005 \pm 0,0002$	$0,3 \pm 0,1$	$-48 \pm 14$	326
W29	$-0,0003 \pm 0,0001$	$0,2 \pm 0,0$	$-29 \pm 7$	328
S30	$-0,0004 \pm 0,0002$	$0,3 \pm 0,1$	$-42 \pm 22$	312
A31	$-0,0007 \pm 0,0001$	$0,4 \pm 0,1$	$-67 \pm 11$	309
I32	$-0,0010 \pm 0,0002$	$0,6 \pm 0,2$	$-94 \pm 23$	318
E33	$-0,0005 \pm 0,0001$	$0,3 \pm 0,1$	$-43 \pm 11$	314
M34	$-0,0005 \pm 0,0002$	$0,3 \pm 0,1$	$-46 \pm 13$	295
E35	$-0,0011 \pm 0,0004$	$0,6 \pm 0,2$	$-92 \pm 34$	288
G36	$-0,0013 \pm 0,0002$	$0,7 \pm 0,1$	$-105 \pm 15$	288
F37	$-0,0009 \pm 0,0002$	$0,5 \pm 0,1$	$-73 \pm 14$	294
K38	$-0,0001 \pm 0,0004$	$0,1 \pm 0,2$	$-13 \pm 31$	312
T39	$-0,0011 \pm 0,0002$	$0,6 \pm 0,1$	$-97 \pm 20$	305
L40	$-0,0011 \pm 0,0002$	$0,7 \pm 0,1$	$-106 \pm 20$	316
K41	$-0,0009 \pm 0,0004$	$0,6 \pm 0,2$	$-91 \pm 32$	315
E42	$-0,0014 \pm 0,0003$	$0,9 \pm 0,2$	$-129 \pm 31$	302
G43	$-0,0008 \pm 0,0001$	$0,5 \pm 0,1$	$-77 \pm 14$	309
Q44	$-0,0010 \pm 0,0003$	$0,6 \pm 0,2$	$-97 \pm 24$	312
V45	$-0,0008 \pm 0,0001$	$0,5 \pm 0,1$	$-79 \pm 10$	313
V46	$-0,0014 \pm 0,0004$	$0,8 \pm 0,3$	$-123 \pm 41$	294
E47	$-0,0008 \pm 0,0002$	$0,5 \pm 0,1$	$-73 \pm 16$	306
F48	$0,0005 \pm 0,0006$	$-0,3 \pm 0,4$	$34 \pm 57$	251
E49	$-0,0003 \pm 0,0001$	$0,2 \pm 0,1$	$-28 \pm 13$	324
I50	$-0,0006 \pm 0,0001$	$0,3 \pm 0,1$	$-51 \pm 10$	310
Q51	$-0,0011 \pm 0,0002$	$0,6 \pm 0,1$	$-95 \pm 22$	304
E52	$-0,0016 \pm 0,0002$	$0,9 \pm 0,1$	$-131 \pm 17$	288
G53	$-0,0012 \pm 0,0001$	$0,7 \pm 0,1$	$-106 \pm 12$	298
K55	$0,0010 \pm 0,0039$	$-0,6 \pm 2,2$	$101 \pm 324$	313
G56	$-0,0011 \pm 0,0002$	$0,6 \pm 0,1$	$-90 \pm 18$	294
Q58	$-0,0005 \pm 0,0001$	$0,3 \pm 0,1$	$-49 \pm 11$	318
A59	$-0,0005 \pm 0,0001$	$0,3 \pm 0,1$	$-48 \pm 11$	317
A60	$-0,0005 \pm 0,0001$	$0,3 \pm 0,1$	$-46 \pm 13$	316
H61	$-0,0007 \pm 0,0002$	$0,4 \pm 0,1$	$-65 \pm 14$	304
V62	$-0,0010 \pm 0,0002$	$0,7 \pm 0,2$	$-99 \pm 23$	313
K63	$-0,0006 \pm 0,0001$	$0,3 \pm 0,1$	$-52 \pm 11$	310
V64	$-0,0005 \pm 0,0001$	$0,3 \pm 0,1$	$-53 \pm 12$	322
V65	$-0,0008 \pm 0,0002$	$0,5 \pm 0,1$	$-81 \pm 20$	322
E66	$-0,0011 \pm 0,0002$	$0,7 \pm 0,1$	$-102 \pm 14$	313

Tab.10.23. Koeffizienten des quadratischen Polynoms zur Näherung der Signalvolumina bei 200 MPa im Temperaturbereich von 255 K bis 339 K. Aus diesen Werten kann die Temperatur  $T_{max}$  des maximalen Signalvolumens berechnet werden (Tab.10.23).

Aminosäure	0,00 GPa	0,05 GPa	0,10 GPa	0,15 GPa	0,20 GPa	Mwt.
Max.	375	360	370	340	341	332
Min.	258	248	224	274	251	273
Mwt.	310	307	306	304	309	308±3
Mwt. Schleifen	317	315	313	309	314	314±3
Mwt. $\beta$ -Stränge	300	296	298	296	302	299±3
form.M1	303	294	224	295	299	283
R2		271	301	299	301	293
G3	310	312	309	310	317	312
K4	317	353	309	283	309	314
V5	313	322	316	309	313	315
K6	316	324	313	312	323	318
W7	319	313	312	309	322	315
F8	326	311	314	310	309	314
D9	346	315	321	320	324	325
S10	287	290	292		302	293
K11	291	299	289	295	299	295
K12	314	308	308	304	311	309
G13	324	315	311	308	316	315
Y14	312	360	285	310	309	315
G15	320	330	317	321	335	325
F16	319	346	326	319	341	330
I17	321	314	321	298	314	314
T18	311	316	309	310	308	311
K19	312	248	316	309	321	301
D20	302	293	304	299	305	301
E21	268	288	287	291	289	285
G22	290	285	290	293	297	291
G23	295	292	286	293	295	292
D24		302	304	303	301	303
V25	321		315	312	318	317
F26	321	331	322	309	328	322
V27	375	321	320	314	320	330
H28	318	311	316	310	326	316
W29	331		339	309	328	327
S30	307	296	313	300	312	306
A31	308	305	311	306	309	308
I32	318	318	313	309	318	315
E33	313	318	315	311	314	314
M34	296	290		286	295	292
E35	292	277	267	293	288	283
G36	293	288		290	288	290
F37	258	328		290	294	293
K38	298	290	289	292	312	296
T39	300	300	305	303	305	303
L40	310	305	313	306	316	310
K41	318	308	306	302	315	310
E42	304	290	301	297	302	299
G43	312	306	311	306	309	309
Q44	313	307	309	307	312	310
V45	314	318	313	309	313	313
V46	282	352	297	286	294	302
E47	302	300	300	300	306	302
F48	284	291	265	274	251	273

E49	317	311	370	340	324	332
I50	315	313	308	302	310	310
Q51	309	317	317		304	312
E52	290	285	259	288	288	282
G53	300	292	298	296	298	297
K55	353	279	336	283	313	313
G56	291	281	283	286	294	287
Q58	317	310	329	301	318	315
A59	319	310	311	307	317	313
A60	316	310	310	308	316	312
H61	307	299	303	302	304	303
V62	306	300	306	307	313	306
K63	313	332	313	340	310	322
V64	319		318	313	322	318
V65	317	313	315	317	322	317
E66	314	309	308	310	313	311

Tab.10.24. Die Temperaturen maximalen Signalenvolumens berechnet aus den quadratischen Polynomen der Temperaturmessreihen von 255 K bis 339 K bei 200 MPa. In der letzten Spalte sind die Mittelwerte der betreffenden Aminosäure über alle Drücke zu finden. Oben wurden Mittelwerte und Extremalwerte über die gesamte Sequenz von *TmCsp* gebildet. Für  $\beta$ -Strang und Schleifenregion wurden die Mittelwerte angegeben.



10.2.5. Die  $J$ -Kopplungen

$J^{\text{HN}}$ [Hz]								
Amino- säure	0,00 GPa	0,05 GPa	0,10 GPa	0,15 GPa	0,20 GPa	$J_2$ [Hz GPa <sup>-2</sup> ]	$J_1$ [Hz GPa <sup>-1</sup> ]	$J_0$ [Hz]
G3	-93,72	-94,45	-94,84	-94,91	-94,64	66 ± 1,0	-17,9 ± 0,2	-93,721 ± 0,003
K4	-94,22	-93,33	-93,05	-93,38	-94,32	-122 ± 1,5	23,9 ± 0,3	-94,220 ± 0,000
V5	-96,03	-94,33	-93,78	-94,39	-96,15	-231 ± 3,2	45,6 ± 0,7	-96,030 ± 0,002
W7	-93,29	-93,16	-92,69	-91,89	-90,76	67 ± 2,3	-0,7 ± 0,5	-93,291 ± 0,002
F8	-91,06	-91,68	-91,81	-91,46	-90,62	97 ± 1,7	-17,2 ± 0,4	-91,060 ± 0,002
D9	-93,88	-94,25	-94,45	-94,48	-94,35	33 ± 0,5	-9,0 ± 0,1	-93,881 ± 0,002
K12	-89,51	-91,14	-92,81	-94,53	-96,29	-9 ± 2,4	-32,1 ± 0,5	-89,510 ± 0,002
G13	-95,74	-94,07	-93,75	-94,76	-97,10	-267 ± 2,8	46,6 ± 0,6	-95,738 ± 0,004
G15	-93,72	-94,45	-94,84	-94,91	-94,64	66 ± 2,0	-17,9 ± 0,4	-93,721 ± 0,003
F16	-93,15	-93,76	-93,90	-93,57	-92,77	94 ± 1,8	-16,9 ± 0,4	-93,150 ± 0,000
I17	-93,18	-93,21	-93,23	-93,25	-93,25	2 ± 0,1	-0,7 ± 0,0	-93,179 ± 0,003
T18	-93,35	-95,06	-95,21	-93,80	-90,82	313 ± 1,3	-49,9 ± 0,3	-93,349 ± 0,002
K19	-98,39	-95,62	-94,31	-94,45	-96,06	-292 ± 5,0	70,0 ± 1,0	-98,391 ± 0,003
D20	-90,97	-95,35	-96,57	-94,62	-89,51	633 ± 4,5	-119,3 ± 0,9	-90,970 ± 0,002
D24	-98,47	-95,38	-93,89	-93,99	-95,70	-320 ± 3,2	77,8 ± 0,7	-98,471 ± 0,003
V25	-93,29	-93,18	-92,72	-91,91	-90,76	69 ± 0,7	-1,2 ± 0,1	-93,291 ± 0,002
F26	-93,88	-94,25	-94,45	-94,48	-94,35	33 ± 1,6	-9,0 ± 0,3	-93,881 ± 0,002
V27	-93,85	-94,43	-94,35	-93,60	-92,20	132 ± 2,4	-18,2 ± 0,5	-93,851 ± 0,003
H28	-94,02	-94,08	-94,11	-94,12	-94,10	5 ± 3,9	-1,4 ± 0,8	-94,020 ± 0,002
W29	-95,68	-94,66	-94,49	-95,17	-96,70	-170 ± 1,8	28,9 ± 0,4	-95,680 ± 0,000
S30	-95,13	-94,54	-94,22	-94,16	-94,38	-54 ± 8,4	14,5 ± 1,8	-95,131 ± 0,003
A31	-91,75	-92,19	-92,82	-93,65	-94,67	-39 ± 1,7	-6,8 ± 0,3	-91,750 ± 0,002
I32	-93,90	-93,28	-92,93	-92,86	-93,08	-56 ± 1,9	15,3 ± 0,4	-93,902 ± 0,004
E33	-94,93	-94,28	-93,73	-93,28	-92,94	-21 ± 2,5	14,1 ± 0,5	-94,931 ± 0,002
T39	-92,56	-93,19	-93,53	-93,59	-93,36	57 ± 5,7	-15,4 1,2	-92,560 0,002
L40	-91,65	-92,32	-92,69	-92,75	-92,51	61 ± 1,0	-16,5 0,2	-91,650 0,002
K41	-92,98	-93,97	-94,30	-93,98	-93,01	131 ± 1,8	-26,3 0,4	-92,981 0,002
E42	-96,84	-94,11	-93,01	-93,55	-95,72	-327 ± 4,8	71,0 1,0	-96,840 0,002
G43	-92,19	-93,12	-93,44	-93,14	-92,22	123 ± 1,0	-24,8 0,2	-92,189 0,002
Q44	-95,50	-94,96	-94,67	-94,62	-94,82	-49 ± 3,2	13,2 0,7	-95,500 0,002
V45	-94,58	-94,36	-93,46	-91,87	-89,59	137 ± 1,1	-2,5 0,2	-94,579 0,002
F48	-91,92	-94,04	-94,80	-94,22	-92,29	270 ± 2,0	-55,8 ± 0,4	-91,921 ± 0,003
E49	-91,49	-90,64	-90,56	-91,26	-92,73	-155 ± 1,1	24,8 ± 0,2	-91,490 ± 0,002
I50	-93,28	-93,57	-93,54	-93,19	-92,52	64 ± 1,7	-9,0 ± 0,4	-93,280 ± 0,000
Q51	-94,82	-95,95	-95,79	-94,34	-91,61	257 ± 0,7	-35,4 ± 0,1	-94,821 ± 0,002
G53	-94,15	-97,90	-99,16	-97,93	-94,21	498 ± 4,2	-99,9 ± 0,9	-94,150 ± 0,000
Q58	-92,80	-94,27	-94,48	-93,43	-91,12	252 ± 2,5	-42,0 ± 0,5	-92,800 ± 0,000
A59	-95,43	-95,12	-94,96	-94,93	-95,04	-28 ± 0,6	7,5 ± 0,1	-95,429 ± 0,003
A60	-94,54	-92,86	-92,52	-93,53	-95,88	-269 ± 2,3	47,1 ± 0,5	-94,540 ± 0,002
H61	-92,81	-93,90	-94,11	-93,45	-91,91	175 ± 3,6	-30,5 ± 0,8	-92,810 ± 0,002
V62	-94,94	-93,75	-93,09	-92,96	-93,36	-106 ± 2,5	29,1 ± 0,5	-94,940 ± 0,000
K63	-95,80	-94,60	-93,94	-93,83	-94,27	-109 ± 3,0	29,5 ± 0,6	-95,801 ± 0,002
V64	-93,48	-92,86	-92,53	-92,48	-92,70	-56 ± 0,7	15,1 ± 0,1	-93,478 ± 0,004
V65	-91,51	-93,09	-93,74	-93,48	-92,29	184 ± 3,2	-40,8 ± 0,7	-91,511 ± 0,003
E66	-91,79	-92,12	-92,31	-92,35	-92,25	29 ± 1,5	-8,1 ± 0,3	-91,790 ± 0,002

Tab.10.25. Die  $J^{\text{HN}}$ -Kopplungen bei 333 K in Abhängigkeit des Drucks. In den Spalten rechts sind die konstanten ( $J_0$ ), linearen ( $J_1$ ) und quadratischen ( $J_2$ ) Koeffizienten der Druckabhängigkeit der  $J$ -Kopplungen aufgelistet.

### 10.3. Restdipolkopplungen

#### 10.3.1. Druckabhängigkeiten der Phospholipidbicellen

D [Hz]											
p [MPa]	303 K	310 K	317 K	331 K	310 K	317 K	324 K	331 K	345 K	359 K	387 K
0,1	7,11	8,60	7,20	7,29	8,32	6,36	6,45	7,85	9,91	9,91	9,72
10	6,36	7,85	8,32	6,92	7,76	7,39	6,08	7,29			
20	3,46	7,48	8,41	6,45	7,29	8,04	5,89	6,92			
25									8,88	9,54	9,16
30	0,00	7,11	8,04	5,98	6,92	7,76	5,70	6,54			
40		5,89	7,67	5,70	6,08	7,48	6,54	6,26			
50		3,09	7,29	5,42	3,55	7,01	7,29	6,08	8,04	9,35	8,88
60		0,00	6,92	5,14	0,00	6,64	7,20	5,89			
70						6,26	6,92	5,61			
75			6,36	5,24					7,39	8,98	8,60
80			4,21	6,36		5,33	6,64	6,64			
90			0,00	6,73		0,00	6,36	7,20			
100				6,36			6,17	7,11	6,92	8,41	8,32
110							5,80	6,92			
120							4,86	6,64			
125									6,45	7,76	8,04
130							4,77				
140							0,00	6,17			
150									6,08	7,48	7,85
160								5,24			
175									7,01	7,20	7,57
180								0,00			
200									7,01	6,83	7,48

Tab.10.26. Aufspaltung des D<sub>2</sub>O Signals in 5 Massenprozent DMPC/DHPC Phospholipidmischung in Abhängigkeit von Druck und Temperatur.

D [Hz]													
p [MPa]	296 K	303 K	310 K	317 K	324 K	331 K	338 K	345 K	352 K	366 K	380 K	394 K	408 K
0,1	4,67	9,57	10,97	14,58	19,02	24,50	25,20	25,30	25,55	25,78	25,55	24,96	23,9
10	4,90	8,98	10,67										
20	3,15	8,28	10,15	14,12	18,43								
30		7,47											
40		6,07	9,10	13,53	17,71								
50		4,32				22,63	23,80	24,26	24,50	24,96	24,61	24,03	23,1
55		0,82											
60			7,70	12,37	17,15								
80			4,90	11,08	15,87								
90			0,50										
100				8,98	14,58	19,60	22,28	23,21	23,56	24,03	24,03	23,45	22,8
120				5,13	12,95								
125						18,08							
130				0,00									
140					10,15								
145					8,98								
150					7,70	16,22	19,83	21,95	22,51	23,33	23,33	23,10	22,3

155	6,30
160	4,70
175	13,42
200	5,60 16,92 20,07 21,58 22,75 22,86 22,40

Tab.10.27. Aufspaltung des D<sub>2</sub>O Signals in 9 Massenprozent DMPC/DHPC Phospholipidmischung in Abhängigkeit von Druck und Temperatur.

### 10.3.2. Die Restdipolkopplungen von *TmCsp*

Amino- säure	0,00 GPa [ppm]	0,05 GPa [ppm]	0,10 GPa [ppm]	0,15 GPa [ppm]	0,20 GPa [ppm]	0,00 GPa [ppm]	0,05 GPa [ppm]	0,10 GPa [ppm]	0,15 GPa [ppm]	0,20 GPa [ppm]
G3	110,16	110,29	110,39	110,50	110,64	108,62	108,73	108,84	108,94	109,08
K4	120,60	120,91	121,19	121,48	121,76	119,06	119,35	119,67	119,96	120,20
V5	125,01	125,27	125,55	125,83	126,12	123,44	123,71	123,99	124,31	124,52
K6	135,18				136,39	135,01	135,29	135,54		135,82
W7	112,83	112,73	112,62	112,59	112,59	111,29	111,21	111,10	111,07	111,10
F8	122,27	122,29	122,33	122,37	122,40	120,76	120,80	120,80	120,86	120,91
D9	129,70	129,87	130,01	130,13	130,26	128,16	128,31	128,45	128,59	128,70
K12	118,82	118,93	119,03	119,11	119,21	117,35	117,44	117,48	117,58	117,62
G13	107,98	108,20	108,30	108,48	108,66	106,41	106,64	106,78	106,91	107,07
G15	106,04	106,11	106,11	106,11	106,14	104,50	104,55	104,55	104,55	104,59
F16	116,28	116,38	116,48	116,58	116,70	114,74	114,86	114,93	115,04	115,17
I17	123,97	123,89	123,81	123,78	123,67	122,44	122,36	122,29	122,22	122,15
T18	125,85	125,94	125,97	126,05	126,05	124,31	124,38	124,42	124,49	124,56
K19	130,36	130,65	130,93	131,22	131,43	128,76	129,06	129,37	129,69	129,83
D20	126,85	127,18	127,43	127,65	127,82	125,35	125,62	125,87	126,05	126,36
G22					112,02					110,43
D24	121,93	121,83	121,76	121,67	121,55	120,29	120,31	120,20	120,09	119,99
V25	121,03	121,09	121,12	121,16	121,12	119,49	119,57	119,60	119,64	119,64
F26	130,83	131,04	131,22	131,40	131,57	129,29	129,48	129,66	129,86	130,01
V27	125,51	125,55	125,55	125,59	125,59	123,97	123,99	123,99	124,06	124,06
H28	128,79	128,91	129,02	129,13	129,16	127,25	127,36	127,46	127,60	127,60
W29	125,25	125,27	125,30	125,34	125,34	123,67	123,71	123,74	123,78	123,74
S30	118,12	118,15	118,11	118,22	118,26	116,55	116,63	116,52	116,70	116,70
A31	125,61	125,76	125,87	125,98	126,01	124,11	124,24	124,35	124,44	124,45
I32	119,42	119,57	119,64	119,78	119,85	117,89	118,01	118,15	118,22	118,33
E33	132,87	132,92	132,92	132,84	132,74	131,30	131,39	131,36	131,30	131,22
E35			122,43	122,44	122,40			120,95	120,90	120,95
T39	114,61	115,07	115,46	115,85	116,17	113,10	113,51	113,90	114,36	114,61
L40	121,46	121,44	121,44	121,48	121,51	119,96	119,92	119,92	119,96	119,99
K41	120,09	119,99	119,92	119,88	119,78	118,55	118,47	118,36	118,33	118,26
E42	122,77	122,89	122,96	123,04	123,11	121,16	121,37	121,44	121,46	121,55
G43	113,60	113,90	114,11	114,36	114,57	112,10	112,34	112,59	112,84	113,05
Q44	120,13	120,20	120,27	120,42	120,45	118,55	118,64	118,72	118,86	118,89
V45	126,35	126,44	126,54	126,72	126,75	124,78	124,91	125,02	125,16	125,30
F48	118,92	118,96	119,03	119,12	119,21	117,42	117,41	117,48	117,58	117,69
E49	119,36	119,35	119,35	119,39	119,39	117,85	117,87	117,87	117,89	117,87
I50	122,10	122,19	122,26	122,29	122,33	120,56	120,66	120,70	120,77	120,80
Q51	127,45	127,60	127,75	127,89	127,89	125,88	126,05	126,19	126,29	126,40
G53	113,20	113,44	113,47	113,60	113,72	111,66	111,81	111,85	112,01	112,16
Q58	120,90	120,95	120,98	121,05	121,05	119,36	119,42	119,42	119,49	119,57
A59	124,51	124,59	124,70	124,81	124,88	122,94	123,04	123,14	123,24	123,32

A60	124,28	124,38	124,45	124,54	124,66	122,74	122,82	122,93	123,04	123,07
H61	118,69	118,89	119,07	119,25	119,46	117,18	117,30	117,55	117,72	117,94
V62	119,12	119,14	119,14	119,18	119,18	117,55	117,62	117,62	117,62	117,65
K63	127,62	127,82	128,03	128,24	128,42	126,05	126,26	126,47	126,72	126,86
V64	124,21	124,38	124,56	124,74	124,88	122,67	122,86	123,04	123,21	123,35
V65	127,89	127,92	127,96	127,99	127,96	126,38	126,40	126,40	126,47	126,44
E66	128,86	128,98	129,09	129,16	129,20	127,35	127,46	127,57	127,65	127,67

Tab.10.28. Die chemischen Verschiebungen der  $^{15}\text{N}^c$  – Dubletts der nicht  $^{15}\text{N}$ -entkoppelten HSQC-Spektren ohne orientierendes Medium bei 333 K.

Amino- säure	0,05 [GPa]	0,1 [GPa]	0,15 [GPa]	0,05 [GPa]	0,1 [GPa]	0,15 [GPa]	0,15 [GPa]	0,15 [GPa]
G3		110,391			108,618		110,458	108,886
K4	120,897	121,265	121,532	119,391	119,759	120,027	121,432	119,926
V5	125,313	125,580	125,847	123,774	124,041	124,342	125,780	124,275
K6		135,616			134,780		135,616	134,680
W7	112,799	112,699		111,227	111,193		112,632	111,059
F8	122,335	122,402	122,436	120,863	120,897	120,897	122,369	120,897
D9	129,863	130,064	130,164	128,023	128,592	128,792	130,097	128,592
K12	118,956	119,023	119,123	117,384	117,484	117,584	119,023	117,484
G13	108,116	108,284	108,417	106,678	106,745	106,912	108,350	106,811
G15	106,109	106,075	106,109	104,603	104,536	104,570	106,042	104,470
F16	116,380	116,480	116,581	114,941	115,008	115,142	116,547	115,109
I17	123,873	123,873		122,535	122,200		123,706	122,267
T18	125,914	126,014		124,475	124,743		125,981	124,442
K19	130,732	130,966		128,658	129,460		131,133	129,628
D20	127,253	127,521	127,755	125,781	125,781	126,216	127,655	125,982
D24	121,900	121,766		120,161	120,227		121,633	120,562
V25	121,063	121,096	121,130	119,624	119,725	119,725	121,096	119,658
F26	131,000	131,235	131,402	129,562	129,829	129,997	131,368	129,896
V27	125,547	125,581	125,614	123,941	123,941	124,008	125,514	123,874
H28	128,926	129,060	129,127	127,354	127,521	127,588	129,060	127,488
W29		125,346			123,674		125,313	123,707
S30		118,152	118,253		116,613	116,647		
A31	125,815	125,949	126,049	124,276	124,309	124,343	126,015	124,343
I32	119,591	119,691	119,792	118,018	118,119	118,253	119,725	118,186
E33	132,940	132,940	132,873	131,401	131,401	131,334	132,806	131,200
E35		122,469			120,897			
T39	115,041		115,810	113,435		114,271	115,743	114,305
L40	121,464	121,464	121,531	119,858	119,959	119,992	121,397	119,925
K41	119,993	119,893	119,859	118,387	118,320	118,254	119,793	118,254
E42							122,971	121,432
G43	113,837	114,138	114,373	112,332	112,666	112,967	114,272	112,800
Q44	120,227	120,328	120,395	118,622	118,789	118,856	120,328	118,789
V45	126,450	126,584		124,978	125,179		126,618	125,179
E47							122,335	120,863
F48	118,956	119,057	119,157	117,417	117,484	117,618	119,090	117,518
E49							119,324	117,785
I50	122,168	122,235		120,596	120,763		122,235	120,729
Q51	127,687	127,821	127,955	126,148	126,282	126,416	127,855	126,249
G53	113,737	113,536	113,670	111,629	111,863	112,098		

G56			109,688			108,450		
Q58	120,964	120,863	120,897	119,257	119,324	119,291	120,796	119,190
A59	124,677	124,711	124,844	122,971	123,105	123,473	124,744	123,172
A60	124,375	124,475	124,609	122,870	122,970	123,070	124,509	123,003
H61	118,822	119,090		117,350	117,518		119,190	117,618
V62	119,157	119,157	119,190	117,551	117,651	117,685	119,123	117,618
K63	127,788	128,022	128,256	126,282	126,516	126,717	128,189	126,684
V64	124,410	124,610	124,778	122,871	123,038	123,406	124,677	123,138
V65	127,956	127,989	128,023	126,350	126,350	126,383	127,956	126,383
E66	129,027	129,160	129,227	127,454	127,588	127,655	129,127	127,588

Tab.10.29. Die chemischen Verschiebungen der  $^{15}\text{N}^{\text{c}}$  – Dubletts im orientierenden Medium der nicht  $^{15}\text{N}$ -entkoppelten HSQC-Spektren bei 333 K. Es wurden eine Druckmessreihe von 50 MPa bis 150 MPa aufgenommen, sowie eine Einzelmessung bei 150 MPa. Bei 200 MPa war keine Orientierung mehr vorhanden. Die Konzentration der DMPC/DHPC Phospholipidmischung betrug jeweils 5 Massenprozent.

Aminosäure	0,00 GPa [Hz]	0,05 GPa [Hz]	0,10 GPa [Hz]	0,15 GPa [Hz]	Fehler	0,15 GPa [Hz]
G3						0,9
K4	-2,0	-2,0	-2,1	-2,2	$\pm 3,5$	-2,1
V5	0,1	-1,0	-2,0	-3,1	$\pm 0,8$	-3,4
W7	6,0	2,6	-0,8	-4,2		3,9
F8	-4,1	-1,9	0,2	2,4	$\pm 1,2$	-1,7
D9						-2,9
K12	6,8	4,1	1,4	-1,3	$\pm 0,8$	-1,0
G13	-7,6	-5,9	-4,2	-2,5	$\pm 2,6$	-1,8
G15	-3,1	-2,4	-1,6	-0,8	$\pm 3,0$	0,9
F16	-5,4	-5,4	-5,3	-5,2	$\pm 1,7$	-5,9
I17						-5,7
T18						0,6
K19						-3,7
D20	-1,9	0,5	2,9	5,3	$\pm 10,8$	8,7
V25	-6,1	-6,5	-6,9	-7,3	$\pm 2,5$	-4,3
F26	-5,9	-7,0	-8,2	-9,3	$\pm 3,0$	-4,9
V27	3,8	4,3	4,7	5,1	$\pm 1,7$	6,5
H28	2,2	1,2	0,2	-0,9	$\pm 3,0$	1,5
W29						2,1
A31	-2,7	1,7	6,0	10,4	$\pm 0,8$	7,9
I32	3,4	2,6	1,7	0,9	$\pm 0,8$	0,6
E33	-1,2	-0,7	-0,2	0,3	$\pm 2,4$	4,3
T39	6,9	4,6	2,4	0,1		-6,0
L40	6,4	4,1	1,9	-0,4	$\pm 2,4$	-3,1
K41	3,4	3,4	3,3	3,3	$\pm 1,6$	-0,1
E42						-0,8
G43	2,1	-1,0	-4,0	-7,0	$\pm 1,8$	-3,3
Q44	3,7	1,8	0,0	-1,8	$\pm 2,6$	-1,2
V45	-1,7	-4,5	-7,3	-10,2		-4,0
F48	1,0	0,9	0,8	0,7	$\pm 1,7$	2,0
E49						1,9
I50	8,1	2,2	-3,7	-9,6		-1,5
Q51	-2,5	-1,7	-0,9	-0,1	$\pm 0,1$	4,0

Q58	10,4	7,8	5,1	2,5	±4,2	4,9
A59	20,0	9,9	-0,2	-10,3	±6,3	0,6
A60	-3,1	-2,4	-1,7	-1,0		-2,6
H61	-10,3	-3,9	2,4	8,7		2,6
V62	5,3	2,6	0,0	-2,7	±1,8	-1,7
K63	-5,0	-3,6	-2,2	-0,9	±0,8	-2,6
V64	7,8	2,9	-1,9	-6,8	±5,1	1,0
V65	4,5	5,4	6,2	7,0	±0,8	2,6
E66	3,7	3,6	3,4	3,3	2,3	1,3

Tab.10.30. Die Restdipolkopplungen basierend auf linearen Näherungen der Messreihen in Tab.10.18. und den Differenzen der Einzelmessungen. Zur Berechnung der Restdipolkopplungen wurden die  $J^{\text{HN}}$ -Kopplungen der Tab.10.24. verwendet. Für Messreihen mit weniger als drei Stützpunkten ist keine Fehlerangabe möglich. Es wurden nur Werte im Bereich  $\pm 15$  Hz berücksichtigt. Da die Aufspaltung durch die Restdipolkopplung von der Konzentration abhängt, ist ein direkter Vergleich der Daten von Einzelmessung bei 150 MPa und der Druckmessreihe nicht möglich.